

УДК 591.463.1+612.616.2:612.014.48

А. В. Клепко✉, **Л. В. Горбань**, **О. А. Мотрина**, **Ю. А. Кондратова**, **А. В. Чернишов**,
С. В. Андрейченко

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050

ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ ЗМІН ФІЗІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СПЕРМИ КРОЛІВ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ ТВАРИН РЕНТГЕНІВСЬКИМИ ПРОМЕНЯМИ

Мета: вивчення впливу рентгенівського випромінювання на морфофункціональні характеристики сперматозоїдів кролів та вміст фруктози, L-карнітину, α -токоферолу, аскорбату і цитрату в їх спермі.

Матеріали та методи. Тотальне опромінення кролів породи Радянська Шиншила здійснювали на установці РУМ-17 в діапазоні доз 1,0–7,0 Гр з потужністю дози $2,8 \cdot 10^{-3}$ Гр/с. Сперму тварин отримували за допомогою штучної вагіни, а потім методом центрифугування розділяли на сперматозоїди та сім'яну рідину. Під мікроскопом “МБИ-6” визначали концентрацію, рухливість, морфологію та лінійну швидкість сперматозоїдів. Визначення вмісту в сім'яній рідині аскорбату, α -токоферолу та L-карнітину проводили на рідинному хроматографі “Agilent 1200”, фруктози і цитрату – спектрофотометрично.

Результати. Показано, що дія рентгенівських променів в дозах 2,0; 5,0 та 7,0 Гр спричиняє дозозалежний пригнічуючий ефект на функціонування передміхурової залози, сім'яних везикул та епідидимісів, що мало прояв у зменшенні вмісту фруктози, цитрату, L-карнітину, α -токоферолу та аскорбату в спермі кролів. Одночасно спостерігалось зростання морфологічних аномалій (пошкодження акросом, голівок та хвостів) сперматозоїдів, згасання їх рухливості та падіння лінійної швидкості.

Висновки. Вивчено динаміку змін морфофункціональних характеристик сперматозоїдів та компонентного складу сім'яної рідини сперми кролів за умов тотального опромінення тварин іонізуючою радіацією в дозах 1,0–7,0 Гр, а також виявлено дозозалежне зростання морфологічних аномалій і зменшення лінійної швидкості сперматозоїдів. Доведено здатність сперми до здійснення пострадіаційного відновлення, повнота якого корелювала з величиною поглинутої дози радіації та величиною пострадіаційного періоду.

Ключові слова: сперматозоїди, сім'яна рідина, кролі, фруктоза, L-карнітин, аскорбат, цитрат, тотальне опромінення.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2013. Вип. 18. С. 338–348.

A. V. Klepko✉, **L. V. Gorban'**, **O. A. Motryna**, **Yu. A. Kondratova**, **A. V. Chernyshov**,
S. V. Andreychenko

State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Variation of rabbit sperm physiologic parameters after the X-ray exposure

Objective. To study the impact of X-irradiation on the morpho-functional characteristics of rabbit spermatozoa and the contents of fructose, L-carnitine, α -tocopherol, ascorbate and citrate in the animal sperm.

Materials and methods. The total body irradiation of rabbits (Soviet Shinchilla) was performed at the RUM-17 device in the dose range of 1.0–7.0 Gy with $2.8 \cdot 10^{-3}$ Gy/sec intensity. The animal sperm was collected by the artificial vagina and then separated on seminal plasma and spermatozoa through centrifugation. Sperm concentration, motility, morphology and linear velocity were identified using the “MBI-6” light microscope. The quantitative deter-

✉ Клепко Алла Володимирівна, e-mail: kallav@mail.ru

© Клепко А. В., Горбань Л. В., Мотрина О. А., Кондратова Ю. А., Чернишов А. В., Андрейченко С. В., 2013

mination of ascorbate, α -tocopherol and L-carnitine in seminal plasma was made on the "Agilent 1200" liquid chromatograph, while the concentration of fructose and citrate was measured on a spectrophotometer.

Results. The X-ray irradiation was shown to cause a dose-dependent suppressing effect on the prostate, seminal vesicles and epididymides expressed through the decreased content of fructose, citrate, L-carnitine, α -tocopherol and ascorbate in a rabbit sperm. Simultaneously the exacerbation of morphologic anomalies (damage of acrosomes, heads and tails) in spermatozoa along with spermatozoid motility and linear velocity decrease were elucidated.

Conclusion. The run-time pattern of morpho-functional changes in spermatozoa together with component content of rabbit sperm in response to the total body irradiation was studied. Consequently the dose dependent raise of morphologic anomalies (damage of acrosomes, heads and tails) in spermatozoa and the slowing of spermatozoid linear velocity was found out. The sperm capacity to fulfill the post-radiation recovery was proven up. The effectiveness of the latter was shown to be dependent upon the radiation dose absorbed and the duration of post-irradiation period.

Key words: spermatozoa, seminal plasma, rabbits, fructose, L-carnitine, ascorbate, citrate, total irradiation.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2013;18:338–348.

Сім'яна рідина являє собою основну складову частину сперми, в котрій містяться сперматозоїди і різні поживні речовини. Останні не тільки забезпечують функціональну активність сперматозоїдів, але й захищають їх від дії пошкоджуючих факторів. Як відомо, L-карнітин, або γ -триметиламонію- β -гідроксибутират, відповідає за транспорт жирних кислот до мітохондрій сперматозоїдів, а тому є ключовою речовиною для їх енергозабезпечення. З іншого боку, L-карнітин діє як антиоксидант, захищаючи сперматозоїди від дії пошкоджуючих факторів, таких як радіація і активні форми кисню (АФК) [1, 2]. Вітамін Е в організмі представлений декількома ізоформами, а саме α -, β -, γ -, δ -токоферолами [3]. Серед вказаних ізоформ, α -токоферол є найбільш активним антиоксидантом сперми, що діє проти пероксидних та алкоксидних радикалів, перешкоджаючи тим самим окисненню подвійних зв'язків в ненасичених жирних кислотах, які у великій кількості містяться в мембранах сперматозоїдів [4, 5]. Фруктоза є джерелом енергії для руху сперматозоїдів, тому її нестача головним чином пов'язана з появою астенозооспермії і може непрямо вказувати на дисфункцію або гіпоплазію сім'яних пухирців, а також закупорку спермального протоку. В той же час, аскорбат та альфа-токоферол запобігають розвитку окисного стресу, руйнуванню життєзабезпечуючих молекул та надмолекулярних структур в сперматозоїдах, а цитрат, як компонент циклу Кребса, сприяє метаболізму поживних речовин та синтезу АТФ [6–9].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета дослідження полягала у вивченні впливу різних доз рентгенівського випромінювання на морфофункціональні характеристики сперматозоїдів, а також вміст фруктози, L-карнітину, α -токоферолу, аскорбату та цитрату в спермі кролів.

Seminal plasma is the main component of ejaculate in which spermatozoa and different nutrition substances are present. The latter not only maintain spermatozoa activity but also protect them from aggressive factors. It is known that carnitine, or γ -trimethylammonium- β -hydroxybutyrate, is responsible for the fatty acids transport to spermatozoid mitochondria, and so is the key substance for their energy supply. On the another hand, the L-carnitine acts as antioxidant, protecting spermatozoa from reactive oxygen species (ROS) [1, 2]. Vitamin E in the body has various isoforms i.e. α -, β -, γ -, δ -tocopherols [3]. Among mentioned isoforms the α -tocopherol is the most active antioxidant in sperm against peroxide and alcoxide radicals, preventing oxidation of double bonds in unsaturated fatty acids, which are present in big amount in spermatozoid membrane [4, 5]. Fructose is the source of energy for spermatozoa motion. That is why its deficiency is mainly connected with presence of asthenozoospermia and may indirectly point to the dysfunction or hypoplasia of seminal vesicles and also to occlusion of semen ductus. At the same time, the ascorbate and α -tocopherol take part in destruction of free radicals and prevent both oxidative stress development and destruction of life-essential molecules and supramolecular structures in spermatozoa [6–9].

OBJECTIVE

The objective of the study was to investigate the effect of different doses of X-ray exposure on morphologic and functional characteristics of rabbit spermatozoa, and also on content of fructose, L-carnitine, α -tocopherol, ascorbate and citrate in rabbit semen.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проведено на білих кролях-самцях віком 30–36 місяців породи Радянська Шиншила (Soviet Shinchilla). Тварини утримувались в окремих клітках у контрольованих умовах, а саме при температурі повітря 16–22°C, світловому дні в 16 годин і освітленості в 38 лк, а також на стандартному харчовому раціоні. Експерименти здійснено у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Збір сперми проводили за допомогою штучної вагіни. Відокремлення сім'яної рідини від сперматозоїдів проводили центрифугуванням при 2500 г 12 хв.

Тотальне опромінення тварин здійснювали на установці РУМ-17 (фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, струм 10 мА, напруга 200 кВ, потужність поглинутої дози 0,0028 Гр/с) в дозах 1,0–7,0 Гр. Після опромінення сперму збирали на 10-ту та 90-ту добу.

Рухливість та морфологічні показники сперматозоїдів оцінювали за допомогою світлової мікроскопії при збільшенні $\times 500$ під мікроскопом "МБИ-6" (Росія) відповідно до протоколу [10]. До уваги брали наступні показники: рухливість, концентрацію сперматозоїдів, прямолінійну швидкість, морфологічні аномалії (пошкодження акросом, голівок та хвостів сперматозоїдів).

Вміст аскорбату в спермі визначали за допомогою хроматографічного методу [11]. До 100 мкл сім'яної рідини в пробірці для центрифугування додавали 900 мкл холодного метанолу, ретельно струшували і центрифугували протягом 3 хв при 10000 об/хв. Пробу надосадової рідини вводили в хроматограф. Хроматографування проводили на рідинному хроматографі "Agilent 1200" зі спектрофотометричним детектором.

Визначення концентрації фруктози в спермі проводили методом фотоколориметрії [6]. Для порівняння готували стандартний зразок фруктози (фірма "Fluka"). Вимірювання зразків проводили на спектрофотометрі "Specoll-211" за допомогою резорцину проти холостої проби при довжині хвилі в 490 нм. Розрахунок вмісту фруктози в пробі проводили за калібрувальним графіком.

Кількісне визначення L-карнітину здійснювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії [12]. Перед початком хроматографії вільний L-карнітин перетворювали у реакції з пара-бромфенобромідом (пбб) у ефір, що мав максимум поглинання при 260 нм. Хроматографічне виділення та ідентифікацію пбб-карнітинового ефіру здійснювали на рідинному хроматографі "Agilent 1200" зі спектрофотометричним детектором. Для порівнян-

MATERIALS AND METHODS

White male rabbits, 30–36 months of age, Soviet Chinchilla breed, were used for the experiments. Animals were treated in separate cages with controlled environment i.e. 16–22°C air temperature, 16 hours light day, 38 luxes illuminating intensity, and standard food formula. Experiments were undertaken in accordance with Convention of European Council about protection of vertebral animals which are used in research purposes. Sperm collecting was made using an artificial vagina. Semen was separated from spermatozoa by centrifugation for 12 minutes at 2500 g.

Animals were totally irradiated at doses from 1.0 to 7.0 Gy at the RUM-17 unit (0.5 mm Cu and 1 mm Al filters, 50 cm focus distance from the skin, 10 mA current, 200 kV voltage, 0.0028 Gy/sec absorbed dose rate). Sperm samples were taken 10 and 90 days after the irradiation.

Sperm motility and morphology were estimated with light microscopy at "МБИ-6" microscope (Russia) under $\times 500$ magnification according to the protocol [10]. The following sperm parameters were studied: motility, spermatozoa concentration, linear velocity, morphologic abnormalities (damage of acrosomes, heads and tails in spermatozoa).

Ascorbate content in semen was measured by chromatography [11]. The 900 μ L of cold methanol were added to 100 μ L of seminal plasma, thoroughly shaken and centrifuged for 3 min at a speed of 10,000 rpm. Supernatant sample was inserted into chromatograph. Chromatography was made on the "Agilent 1200" liquid chromatograph with spectrophotometric detector.

Fructose concentration in semen was measured by photocolometric method [6]. Standard sample of fructose ("Fluka") was prepared for a comparison. Samples detection was made on the "SPECORD-M40" spectrophotometer with 490 nm wave length against the blank. Calculation of fructose content in a probe was done by calibrating graphic.

Quantitative detection of L-carnitine was done by highly effective liquid chromatography [12]. Before starting of chromatography a free L-carnitine was transformed into ether in reaction with para-bromophenobromide (pbb) which had maximum of absorption within 260 nm. Chromatographic separation and identification of pbb-carnitine ether was done on the "Agilent 1200" liquid chromatograph with spectrophotometric detector.

ня використовували стандартний розчин карнітину гідрохлориду фірми “Sigma” (Німеччина).

При оцінці вмісту α -токоферолу його попередньо екстрагували з сім'яної рідини за допомогою гексану [13]. Хроматографічне розділення здійснювали на приладі “Agilent 1200” з колонкою Beckman Ultrasphere-ODS (розмір 4.6x250 mm). Концентрацію α -токоферолу визначали за допомогою аналізу інтенсивності флуоресценції при довжині хвилі в 330 нм. Для порівняння використовували розчин стандарту α -токоферолу в етанолі.

Вміст цитрату в спермі кролів визначали у відповідності з протоколом роботи [8].

Статистичний аналіз цифрових даних проводили із застосуванням дисперсійного аналізу “ANOVA” та непарного тесту Стьюдента з поправкою Бонфероні. Довірчі інтервали для середніх значень визначали за допомогою t-критерію при $p=0,95$ на підставі підрахунку стандартної похибки. Основу статистичної обробки складали двобічні криві розподілу випадкових даних. Відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$ [14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що цикл сперматогенного епітелію у кролів становить 10 діб, а повне його оновлення відбувається приблизно за 60 днів. Тому для дослідження пострадіаційних ефектів іонізуючого опромінення на якість сперми лабораторних кролів було вибрано саме терміни в 10 та 90 діб. Аналіз фізіологічних показників сперми показав (рис. 1), що тотальне опромінення тварин в дозі 1,0 Гр через 10 діб призводило до незначного зростання рухливості сперматозоїдів, однак вже при дії іонізуючої радіації в дозі 2,0 Гр цей показник зменшувався до 45 % контрольної величини, котра дорівнювала 63–71 % рухливих сперматозоїдів від їх загальної кількості. При опроміненні тварин в дозах 5,0 та 7,0 Гр досліджуваний показник за середнім значенням не перевищував 36 та 31 %, відповідно.

Морфологічні аномалії (пошкодження акросом, голівок та хвостів) сперматозоїдів кролів через 10 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр дорівнювали 138 % контролю, тоді як збільшення дози іонізуючої радіації спричиняло подальше зростання морфологічних дефектів в сперматозоїдах. Середня кількість морфологічно аномальних сперматозоїдів при опроміненні в дозах 2,0; 5,0 та 7,0 Гр зростала відповідно на 61, 208 та 275 % порівняно з контролем, що в наших дослідах не перевищував 15 % загальної кількості сперматозоїдів.

Одночасно було відмічено, що прямолінійна швидкість сперматозоїдів (див. рис.1) після невеликого зрос-

Standard solution of carnithine hydrochloride “Sigma” (Germany) was used for a comparison.

To assay the α -tocopherol level it was preliminarily extracted from semen using hexane [13]. Chromatographic separation was made on the “Agilent 1200” device with Beckman Ultrasphere-ODS column (4.6x250 mm size). α -Tocopherol concentration was measured through the analysis of fluorescence intensity at a 330 nm wave length. Solution of α -tocopherol in ethanol was used for a comparison.

The citrate content in rabbit semen was assayed according to the protocol [8].

Statistic analysis of results was made using the analysis of variance (ANOVA) and unpaired Student's test with Bonferroni correction. Confidence intervals for the mean values were determined using t-criterion within $p=0.95$ on the basis of standard error calculation. The two-tailed curves of accidental data distribution served as a basis for statistic analysis. Difference was considered significant while $p \leq 0.05$ [14].

RESULTS AND DISCUSSION

It is known that a complete cycle of spermatogenic epithelium renewal in rabbits is 10 days, and its complete renewal takes place in about 60 days. That is why periods of 10 and 90 days were chosen for the study of ionizing irradiation effects on laboratory rabbit sperm quality. Analysis of physiological parameters of rabbit sperm showed (Fig. 1) that total irradiation of animals at a dose of 1.0 Gy led to modest increase of spermatozoa motility, but in case of irradiation at a dose of 2.0 Gy this index dropped to 45 % from the control level, the latter being 63–71 % of motile spermatozoa from from all of them. Under animal irradiation at 5.0 and 7.0 Gy doses this index did not exceed 36 % and 31 % respectively (mean values).

Morphologic anomalies (damage of acrosomes, heads and tails) of rabbit spermatozoa were equal to 138 % from control 10 days after irradiation at a dose of 1.0 Gy, while dose elevation led to the further growth of morphologic spermatozoa defects. Mean values of morphologically abnormal spermatozoa increased to 61%, 208 % and 275% upon exposure to 2.0, 5.0 and 7.0 Gy doses respectively in comparison to control which did not exceed 15% of general spermatozoa quantity in our experiments.

Also it was found that linear sperm velocity (see Fig. 1) after modest increase upon irradiation at a

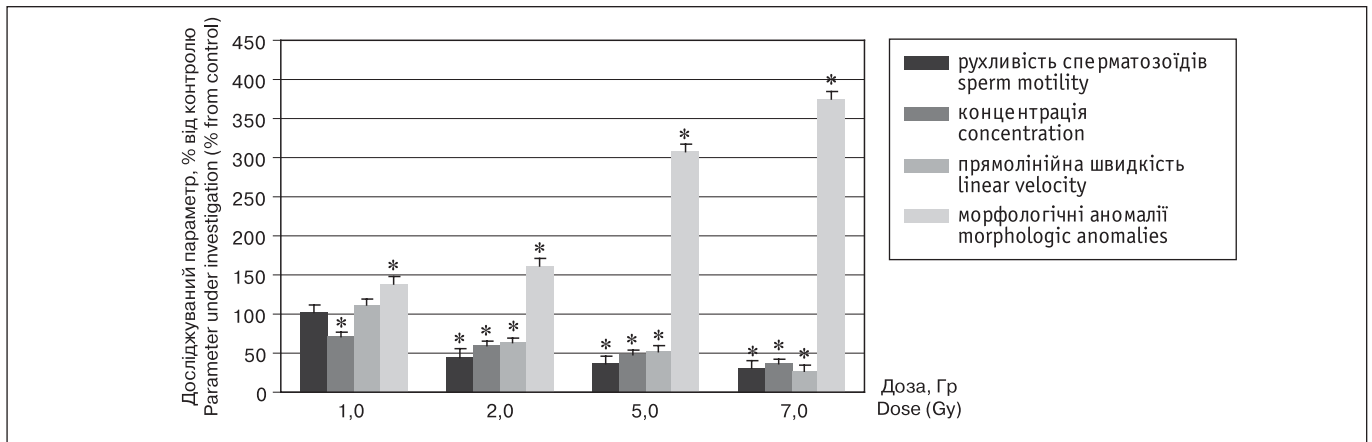


Рисунок 1. Рухливість, концентрація, лінійна швидкість та морфологічні аномалії сперматозоїдів кролів через 10 діб після тотального опромінення тварин в дозах 1,0–7,0 Гр.

Figure 1. Motility, concentration, linear velocity and morphologic anomalies of rabbit spermatozoa 10 days upon of total irradiation at the doses of 1.0–7.0 Gy.

Примітка. * – статистично достовірні розбіжності з контролем ($p \leq 0,05$).
Note. * – significant differences from control ($p \leq 0.05$)

тання при опроміненні в дозі 1,0 Гр, при дозах в 2,0; 5,0 та 7,0 Гр поступово зменшувалась з 67 до 27 % контрольної величини, котра становила (144 ± 14) мкм/с.

Через 3 місяці після опромінення кролів в дозі 1,0 Гр рухливість сперматозоїдів трохи зменшувалась (рис. 2). Однак за дії такої дози було помічено зростання морфологічних дефектів в сперматозоїдах кролів до 140 % контрольної величини. Показано, що при тотальному опроміненні кролів в дозі 2,0 Гр через 3 місяці рухливість сперматозоїдів залишалася нижчою за контрольну величину на 20 %.

Поряд з цим, кількість морфологічно змінених сперматозоїдів була досить високою і перевищувала контрольні значення на 110, 360 і 470 % для доз 2,0; 5,0 та 7,0 Гр, відповідно. Величина таких показників, як лінійна швидкість та концентрація сперматозоїдів зменшувалась, починаючи з дози опромінення тварин в 1,0 Гр, при цьому найбільше пригнічення цих параметрів відмічено при дозі в 7,0 Гр, коли вони становили не більше 18 % контрольного значення.

Проведення аналізу динаміки виявлених морфологічних змін дозволило виявити, що при тотальному опроміненні тварин в дозі 1,0 Гр спостерігалось статистично достовірне збільшення морфологічних аномалій в сперматозоїдах кролів через 10 діб, при цьому зі збільшенням пострадіаційного періоду виявлений ефект не змінювався. Опромінення в дозі 2 Гр призводило до статистично достовірних змін всіх досліджуваних морфологічних показників. При цьому найбільший негативний ефект радіації на якість сперми кролів було виявлено на 10-ту добу. Слід відмітити, що через 90 діб після оп-

dose of 1.0 Gy dropped gradually from 67 % to 27 % of control value, the latter being equal to 144 ± 14 $\mu\text{m}/\text{sec}$.

Sperm motility slightly diminished 3 months upon irradiation of the rabbits at a dose of 1.0 Gy (Fig. 2). But even under exposure at a dose of such a value the morphologic defects amount grew to 140 % from a control value. It was shown that under total exposure at a dose of 2.0 Gy the sperm motility remained for 20 % lower than control value 3 months after exposure.

However, the number of morphologically abnormal spermatozoa were quite high and exceeded the control values for 110%, 360% and 470% under 2.0, 5.0 and 7.0 Gy exposure respectively. Such parameters as spermatozoid linear velocity and sperm concentration dropped beginning from the dose of 1.0 Gy, while the most decrease of these parameters was found at a dose of 7.0 Gy not exceeding 18 % from control.

The run-time analysis of morphologic and functional changes revealed that amount of spermatozoa anomalies in animals irradiated at a dose of 1.0 Gy had significantly increased 10 days after the exposure, but with further protrusion of post-irradiation period the revealed effect did not change. Irradiation at a dose of 2.0 Gy led to the statistically significant changes of all studied morphologic and physiologic spermatozoa parameters. At that the worst unfavorable effect of irradiation on sperm was found 10 days after exposure. Moreover, 90 days after exposure

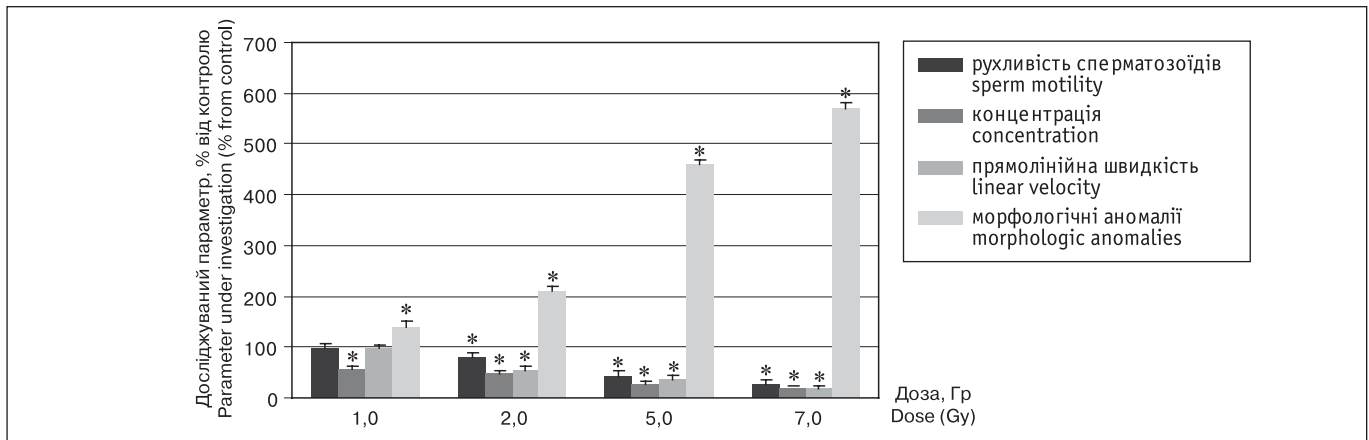


Рисунок 2. Рухливість, концентрація, лінійна швидкість та морфологічні аномалії сперматозоїдів кролів через 90 дів після тотального опромінення тварин в дозах 1,0–7,0 Гр.

Figure 2. Motility, concentration, linear velocity and morphologic anomalies of rabbit spermatozoa 90 days upon total irradiation at the doses of 1.0–7.0 Gy.

Примітка. * – статистично достовірні розбіжності з контролем ($p \leq 0,05$).
Note. * – significant differences from control ($p \leq 0.05$)

ромінення в дозі 2 Гр нормалізації виявлених порушень не спостерігалось.

Проведені дослідження встановили радіостимулюючий ефект тотального опромінення кролів на лінійну швидкість сперматозоїдів при дозі в 1,0 Гр. В цьому зв'язку слід згадати, що посилення рухливої функції було встановлено також і для опромінених *in vitro* сперматозоїдів щурів [15]. Ці факти вказують на деяке посилення фізіологічної функції епідидимісів, які відповідають за дозрівання сперматозоїдів і набуття ними кінетичних характеристик.

Відомо, що складові компоненти сім'яної рідини сперми, не тільки забезпечують нормальне функціонування сперматозоїдів, а й проявляють антиоксидантні властивості, захищаючи сперматозоїди від пошкоджуючої дії АФК. Наявність L-карнітину, α -токоферолу та аскорбату в сім'яній рідині особливо важлива в умовах впливу як хімічних, так і фізичних чинників навколишнього середовища, дія яких призводить до надмірного продукування АФК та виникнення різних патологічних станів у живому організмі.

Результати визначення концентрації фруктози, L-карнітину, α -токоферолу, аскорбату та цитрату в сім'яній рідині кролів після одноразового тотального опромінення тварин в діапазоні доз 1,0–7,0 Гр, наведені на рис. 3 та 4.

Встановлено, що опромінення тварин рентгенівськими променями в дозі 1,0 Гр не викликало змін концентрації L-карнітину та фруктози в сім'яній рідині, але при дозі в 2,0 Гр вміст L-карнітину зменшився до 70 % контрольної величини, що була в межах 3–10 мкмоль/л, тоді як рівень фруктози становив 62 % контрольного зна-

то 2.0 Gy there was no normalization of the found abnormalities.

In our study the radio-stimulative effect of total irradiation of rabbits on linear spermatozoa velocity was found at a dose of 1.0 Gy. It is interesting that amplification of motility was found also for the irradiated rat spermatozoa *in vitro* [15]. These facts point to a slight growth of physiologic activity of epididymis, which are responsible for sperm maturation and acquisition of their kinetic characteristics.

It is known, that components of semen not only maintain normal functioning of spermatozoa, but also have antioxidant capacities, protecting spermatozoa from destructive influence of ROS. L-carnitine, α -tocopherol and ascorbate contents in semen are essentially important under the influence of chemical and physical environmental factors, because in this situation the abnormal production of ROS leads to different pathologic states in the body.

Results of fructose, L-carnitine, α -tocopherol, ascorbate and citrate levels assay in rabbit semen after a one-time total radiation exposure of animals at doses of 1.0–7.0 Gy are shown in Figures 3 and 4.

It was found that 1.0 Gy X-ray exposure of animals did not make any changes in L-carnitine and fructose concentrations in semen, but under 2.0 Gy exposure the L-carnitine levels dropped to 70 % of control value, the latter being 2–10 $\mu\text{mol/L}$, and fructose levels were 62 % from control (Fig. 3).

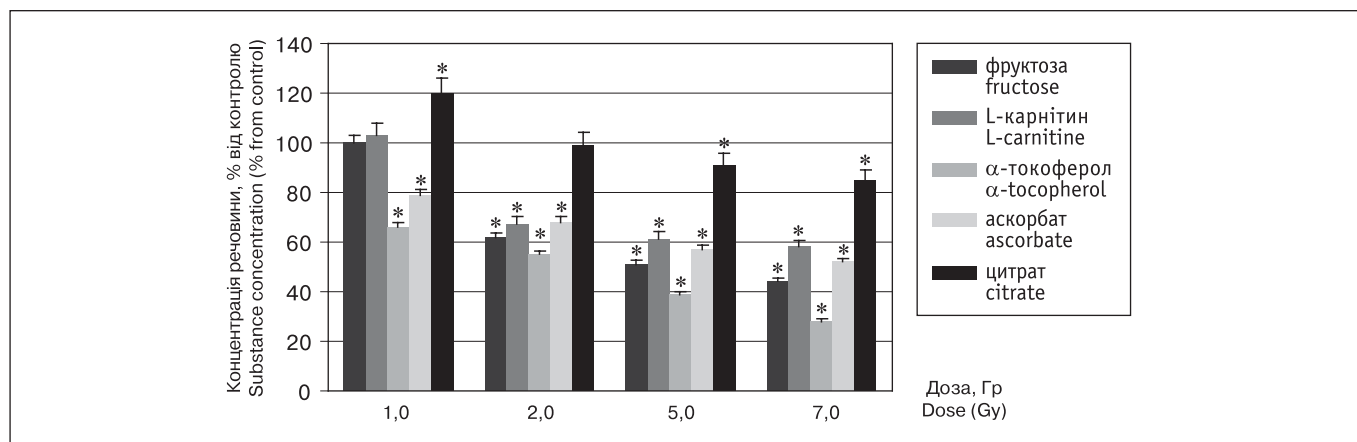


Рисунок 3. Концентрація фруктози, L-карнітину, α-токоферолу, аскорбату та цитрату в сім'яній рідині кролів через 10 діб після їх тотального опромінення в дозах 1,0–7,0 Гр.

Figure 3. Concentration of fructose, L-carnitine, α-tocopherol, ascorbate and citrate in rabbit seminal plasma 10 days upon animal total irradiation at doses of 1.0–7.0 Gy.

Примітка. * – статистично достовірні розбіжності з контролем ($p \leq 0,05$).
Note. * – significant differences from control ($p \leq 0.05$)

чення (див. рис. 3). З ростом дози до 5,0 та 7,0 Гр концентрація фруктози в сім'яній рідині кролів поступово знижувалась до 43 % в порівнянні з контролем, що дорівнював 4,97 мг/мл, а L-карнітину – до 59 %.

Зі збільшенням часу пострадіаційного періоду до 3 місяців після опромінення в дозі 1,0 Гр не було встановлено вірогідних відмінностей в концентрації фруктози та L-карнітину в сім'яній рідині кролів, порівняно з контролем (див. рис. 4). Однак вже при дозі в 2,0 Гр вміст L-карнітину підвищився до 94 % контрольного значення, а при дозах 5,0 та 7,0 Гр – до 83 та 80 %, відповідно. Натомість концентрація фруктози в сім'яній рідині досягла рівня контролю при дозах 1,0 та 2,0 Гр, а при дозі в 7,0 Гр було зафіксовано її найменше значення на цей період, що становило 77 % контролю. Таким чином, через 3 місяці після опромінення відмічено поступову нормалізацію вмісту фруктози та L-карнітину в сім'яній рідині кролів.

В досліджах також було встановлено суттєве зменшення вмісту α-токоферолу в сім'яній рідині до 64 % контролю на 10-ту добу після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр (див. рис. 3). При цьому рівень аскорбату становив 79 % контролю. З ростом дози опромінення концентрація α-токоферолу продовжувала зменшуватись майже в лінійній залежності і досягала 36 % контрольного значення при дозі в 7,0 Гр. Одночасно рівень аскорбату також знижувався, але значно повільніше. Тому при дозі в 7,0 Гр його концентрація дорівнювала 52 % контролю.

На 90-ту добу після опромінення було відмічено зменшення вмісту α-токоферолу в сім'яній рідині кролів порівняно з терміном в 10 діб при дозах в 2,0 та

With dose increase to 5.0 and 7.0 Gy the fructose concentrations gradually decreased to 43 % from the control, which was 4.97 mg/mL, and L-carnitine – to 59 % respectively.

There were no significant differences from control in concentrations of fructose and L-carnitine in a rabbit semen 3 months after the exposure at the 1.0 Gy dose (Fig. 4). However, under 2.0 Gy exposure the L-carnitine level increased to 94 % from control, and under 5.0 Gy and 7.0 Gy exposure – to 83 % and 80 % respectively. Moreover, the fructose concentration in semen was within the control ranges under 1.0 and 2.0 Gy exposure, though under 7.0 Gy its value was the lowest for this period being equal to 77 % from the control. Thus, a gradual normalization of fructose and L-carnitine levels was marked in rabbit semen 3 months after exposure.

Significant decrease of the α-tocopherol concentration in semen to 64 % from the control value was found 10 days after exposure to 1.0 Gy (see Fig. 3). At the same time the ascorbate level was equal to 79 % from the control. The α-tocopherol concentration continued dropping along with radiation dose increase almost in a linear mode reaching down to 36 % from the control at a dose of 7.0 Gy. At the same time the ascorbate level decreased more slowly. Within 7.0 Gy exposure its concentration was 52 % from the control.

The α-tocopherol levels were lower at day 90 after the exposure at 2.0 and 5.0 Gy doses compared to patterns 10 days upon exposure, while

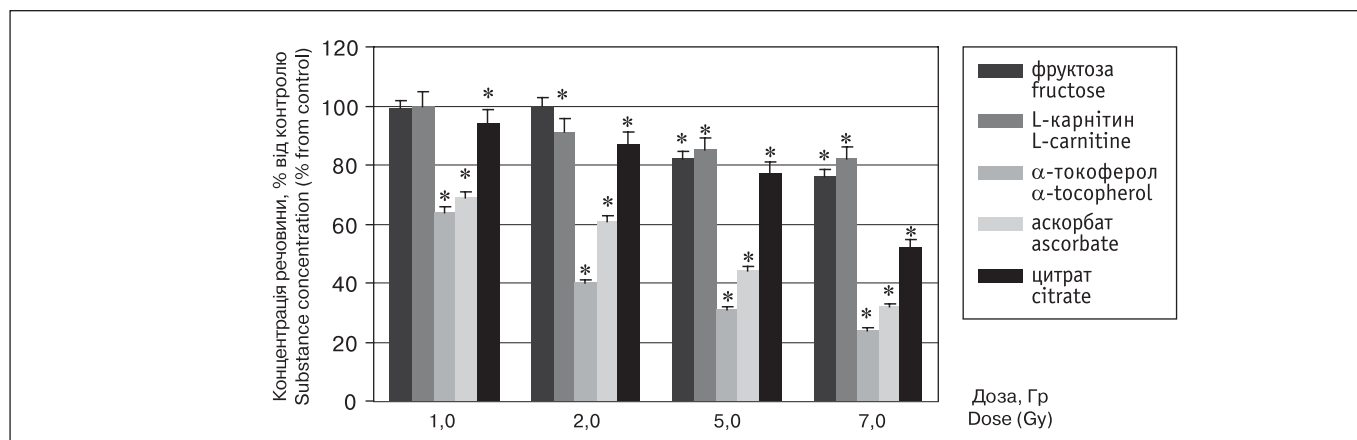


Рисунок 4. Концентрація фруктози, L-карнітину, α-токоферолу, аскорбату та цитрату в сім'яній рідині кролів через 90 діб після їх тотального опромінення в дозах 1,0–7,0 Гр.

Figure 4. Concentration of fructose, L-carnitine, α-tocopherol, ascorbate and citrate in rabbit seminal plasma 90 days upon animal total irradiation at doses of 1.0–7.0 Gy.

Примітка. * – статистично достовірні розбіжності з контролем ($p \leq 0,05$).
Note. * – significant differences from control ($p \leq 0,05$)

5,0 Гр, тоді як для дози в 7,0 Гр розбіжність величини була в межах статистичної похибки (див. рис. 4). На 90-ту добу встановлене зменшення вмісту аскорбату в спермі становило 28 %, а після 90 діб – 40 %.

Як бачимо, на відміну від фруктози, концентрації α-токоферолу та аскорбату залишалися зниженими порівняно з контролем для всіх доз опромінення навіть у тримісячний термін. Довготривале зменшення α-токоферолу та аскорбату можна пояснити за рахунок їх безпосередньої участі у здійсненні протирадіаційного захисту мембран сперматозоїдів шляхом знешкодження вільних радикалів та активних форм кисню.

Аналіз вмісту цитрату, що постачається в сім'яну рідину кролів простатою, виявив посилення його продукування на 20 % порівняно з контрольним значенням на 10-ту добу після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр (див. рис. 3). Однак на 90-ту добу вміст цитрату в сім'яній рідині знижувався лише до 94 % контролю (див. рис. 4). За умов зростання дози опромінення концентрація цитрату в сім'яній рідині поступово зменшувалась для обох термінів після дії іонізуючого випромінювання, при цьому за дози в 7,0 Гр на 90-ту добу було зафіксовано найменшу концентрацію цитрату, що дорівнювала 52 % контролю. Отримані дані свідчать про можливість стимулюючої дії на простату іонізуючої радіації при дозі в 1,0 Гр на 10-ту добу після опромінення. Більш високі дози спричиняли пригнічуючий ефект на простату як на початку, так і в кінці дослідженого пострадіаційного періоду.

Проведеними дослідженнями встановлено, що сперматозоїди кролів є достатньо радіорезистентним

within 7.0 Gy exposure their dispersion was within the standard error ranges (see Fig. 4). On the 90th day the ascorbate level dropped to 28 % and after 90 days – to 40 % respectively.

As one can see, in contrast to fructose, the concentrations of α-tocopherol and ascorbate remained decreased vs. control under all exposure doses even in a 3-month term. The long-lasting decrease of α-tocopherol and ascorbate concentrations can be explained at the expense of their possible direct involvement in irradiation protection of spermatozoa membranes through neutralizing the free radicals and ROS.

It is known that citrate comes to seminal plasma of rabbits from the prostate. Analysis of the citrate content showed the up-regulation of its production for 20 % compared to control 10 days after exposure at a dose of 1.0 Gy (see Fig. 3). However, on the 90th day the citrate concentration was only 94 % from the control (see Fig. 4). Seminal citrate concentration gradually diminished for both terms after the exposure dose increase, and the lowest citrate concentration was determined at the dose of 7.0 Gy on the 90th day being 52 % from the control value. Our data suggest the possibility of stimulation of prostate function by ionizing radiation at a dose of 1.0 Gy on the 10th day after exposure. Higher doses make suppressive effect on prostate either at the beginning or at the end of post-irradiation period.

It was shown in our study that rabbit spermatozoa are the quite radioresistant biological objects

біооб'єктом, що може зберігати свою рухливість до 7 Гр. Таке спостереження повністю співпадає із законом Бергон'є та Трібондо, який вказує, що висока радіорезистентність притаманна саме високодиференційованим клітинам, до яких належать і сперматозоїди. Нашими дослідженнями було встановлено, що радіація по-різному впливає на сперматозоїди. Так, при відносно невеликій дозі в 1 Гр спостерігався радіостимулюючий ефект, котрий зумовлював статистично достовірне підвищення рухливості сперматозоїдів. Однак з ростом дози збільшувалась кількість морфологічних аномалій в сперматозоїдах, які негативно впливали на рухливість і спричиняли імобілізацію.

Відомо, що епідидимальні клітини виробляють L-карнітин і постачають його в сім'яну рідину. Останній забезпечує транспорт жирних кислот до мітохондрій сперматозоїдів, а також знешкодження АФК. Тому незначне підвищення концентрації карнітину в сім'яній рідині кролів при дозі в 1,0 Гр мало сприяти збільшенню рухливості і прояву радіостимулюючого ефекту на сперматозоїди. Цікаво, що при більших дозах опромінення зменшення рухливості сперматозоїдів поєднувалось з відповідним падінням концентрації карнітину. На відміну від карнітину, концентрація α -токоферолу і аскорбату в усіх варіантах експерименту не перевищувала контрольний рівень. В цьому зв'язку, слід припустити, що α -токоферол і аскорбат завдяки своїм радіопротекторним властивостям витрачаються на антирадіаційний захист клітинних мембран, особливо в сперматозоїдах, де в надлишку представлений ненасичений жирнокислотний компонент. При зростанні дози опромінення і посиленні негативних радіаційних ефектів в живому організмі метаболізація α -токоферолу і аскорбату в радіопротекторних цілях неминуче ставала більш довготривалою. Враховуючи значну залежність репараційних процесів від енергопостачання, легко зрозуміти причини дозозалежного зменшення концентрації цитрату в спермі, що витрачався в процесах катаболізму для синтезу АТФ.

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження показали, що опромінення лабораторних кролів рентгенівськими променями в дозі 1,0 Гр не впливало на рухливість сперматозоїдів, хоча підвищувало їх прямолінійну швидкість в 1,4 раза. Опромінення в дозах 2,0–7,0 Гр спричиняло дозозалежне пригнічення рухливості та лінійної швидкості сперматозоїдів, а також зменшення концентрації сперматозоїдів в спермі. При цьому

remaining motile up to 7.0 Gy dose of exposure. These findings are in agreement with the law by J. Bergonie and L. Tribondeau which tells that high radio-resistance is a characteristic feature of highly differentiated cells, e.g. spermatozoa. Our studies showed that radiation makes a variable influence on spermatozoa. At a relatively low dose of 1 Gy the radio-stimulation effect was observed, promoting the up-regulation of sperm motility. However, with dose elevation the quantity of morphologic anomalies in spermatozoa increased, which had a negative impact on motility and provoked immobilization.

It is known that epididymal cells produce L-carnitine and provide it to semen. L-carnitine promotes fatty acids transport to spermatozoa mitochondria, and also the ROS inactivation. That is why modest elevation of carnitine concentration in rabbit semen at a dose of 1.0 Gy could favor the up-regulation of motility and providing the radio-stimulating effect on spermatozoa. It is interesting that at higher exposure doses the down-regulation of sperm motility was accompanied by a corresponding decrease of carnitine concentration. In contrast, the α -tocopherol and ascorbate concentrations in all experimental conditions did not exceed the control levels. In this case it is possible to speculate that α -tocopherol and ascorbate due to their radio-protective abilities are utilized for the anti-radiation defense of cell membranes, especially in spermatozoa where concentration of unsaturated fatty acids is very high. With exposure dose elevation and enhancing of negative radiation effects in living body the metabolism of α -tocopherol and ascorbate in the radio-protective purposes unavoidably had become more long-term. Taking into account a strong dependence of reparative processes on energy supply it is quite clear that dose-dependent down-regulation of seminal citrate concentrations was due to its consuming in catabolism process for the ATP synthesis.

CONCLUSIONS

1. It was shown in our study that 1.0 Gy X-ray exposure of rabbits did not influence the motility of their spermatozoa, although facilitating its linear velocity in 1.4 times. The 2.0–7.0 Gy exposure had a dose-depending inhibitory effect on motility and linear velocity of spermatozoa and provoked a down-regulation of spermatozoa concentration in a sperm. The amount of mor-

кількість морфологічних дефектів у сперматозоїдах зростала.

2. Виявлено, що тотальне опромінення кролів іонізуючою радіацією призводить до підвищення рівня L-карнітину в сім'яній рідині за межі контрольних значень при дозі в 1,0 Гр на 10-ту добу після опромінення. Однак, при дозах в 2,0; 5,0 та 7,0 Гр концентрація карнітину знижувалась, при цьому найбільше зменшення концентрації виявлено на 90-ту добу. При всіх досліджуваних дозах спостерігалось зменшення концентрації α -токоферолу в сім'яній рідині. Пригнічуючий ефект радіації щодо α -токоферолу в сім'яній рідині мав більш довготривалий порівняно з L-карнітином прояв.

3. Встановлено, що дія іонізуючої радіації в діапазоні доз 2,0–7,0 Гр спричиняє пригнічуючий ефект на активність передміхурової залози та сім'яних везикул кролів, який проявився у зменшенні концентрації цитрату, аскорбату та фруктози у спермі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lenzi A. Characterization of human sperm / A. Lenzi, F. Gandini // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17. – P. 842–849.
2. Vicari F. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculopididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds / F. Vicari, S. La Vignera, A. E. Calogero // Fertil. Steril. – 2002. – Vol. 78, N 6. – P. 1203–1208.
3. α -Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes / P. Therond, J. Auger, A. Legrand, P. Jouannet // Mol. Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 2, N 10. – P. 739–744.
4. Vitamin E biochemistry and function: a case study in male rabbit / C. Castellini, E. Mourvaki, A. Dal Bosco, F. Galli // Reprod. Dom. Anim. – 2007. – Vol. 42, N 3. – P. 248–256.
5. Zanibonil L. Fatty acid and tocopherol composition of semen components in the rabbit / L. Zanibonil, T. Gliozzit, A. Maldjian // Proc. of 8th World Rabbit Congress (Puebla, 7–10 September). – Mexico, 2004. – P. 365–370.
6. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma / D. L. Lewis-Jones, I. A. Aird, M. M. Biljan, C. R. Kingsland // Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 11, N 11. – P. 2465–2467.
7. Gonzales G. F. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men / G. F. Gonzales, A. Villena // Int. J. Androl. – 2001. – Vol. 24, N 5. – P. 255–260.
8. Mollineau W. M. Spermatozoa morphologies and fructose and citric acid concentrations in agouti (*Dasyprocta leporina*) semen / W. M. Mollineau, A. O. Adogwa, G. W. Garcia // Anim. Reprod. Sci. – 2008. – Vol. 105, N 3-4. – P. 378–383.
9. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: detection and interrelationship with chemiluminescence's in washed semen / J. J. Thiele, H. J.

phologic defects in spermatozoa increased at that.

2. As is was revealed in the study, a total exposure of rabbits to ionizing irradiation at a dose of 1.0 Gy leads to increase of L-carnitine level in semen above the control ranges on the 10th day after exposure. However, at the doses of 2.0, 5.0 and 7.0 Gy the carnitine concentrations dropped. The lowest concentration was registered at that on the 90th day. Under the all applied doses a decrease of α -tocopherol concentration in semen was observed. Inhibitory effect of radiation on α -tocopherol in semen was longer in time in comparison to effect on L-carnitine.

3. It was found, that exposure at the doses of 2.0–7.0 Gy has a suppressive effect on prostate and seminal vesicles activity expressed in a decreased concentrations of citrate, ascorbate and fructose in rabbit sperm.

REFERENCES

1. Lenzi A, Gandini F. Characterization of human sperm. Hum Reprod. 2002;17:842–9.
2. Vicari F, Vignera SL, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculopididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. Fertil Steril. 2002 Dec;78(6):1203–8.
3. Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P. α -Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. Mol Hum Reprod. 1996; 2(10):739–44.
4. Castellini C, Mourvaki E, Bosco AD, Galli F. Vitamin E biochemistry and function: a case study in male rabbit. Reprod Dom Anim. 2007;42(3):248–56.
5. Zanibonil L, Gliozzit T, Maldjian A. Fatty acid and tocopherol composition of semen components in the rabbit. In: Proc of 8th World Rabbit Congress. 2004 Sept 7–10; Puebla, Mexico. Puebla; 2004. p. 365–70.
6. Lewis-Jones DL, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. Hum Reprod. 1996;11(11):2465–7.
7. Gonzales GF, Villena A. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. Int J Androl. 2001;24(5):255–60.
8. Mollineau WM, Adogwa AO, Garcia GW. Spermatozoa morphologies and fructose and citric acid concentrations in agouti (*Dasyprocta leporina*) semen. Anim Reprod Sci. 2008;105(3–4): 378–83.
9. Thiele JJ, Freisleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: detection and interrelation-

- Freisleben, J. Fuchs, F. R. Ochsendorf // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, N 1. – P. 110–115.
10. Castellini C. Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does / C. Castellini, P. Lattaioli // Anim. Reprod. Sci. – 1999. – Vol. 57, N 1–2. – P. 115–124.
11. Colagar A. H. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality / A. H. Colagar, E. T. Marzony // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2009. – Vol. 45, N 2. – P. 144–149.
12. Li K. Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility / K. Li, W. Li, Y. Huang // Clinica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 378, N 1–2. – P. 159–163.
13. Zaspel B. J. Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography / B. J. Zaspel, A. S. Csallany // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 130, N 1. – P. 146–150.
14. Bland M. An introduction to medical statistics / M. Bland. – 3rd ed. – Oxford : Oxford Univ. Press, 2007. – 405 p.
15. Булавицька В. М. Радіостимулююча дія іонізуючої радіації на сперматозоїди щурів / В. М. Булавицька, В. В. Талько // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. – 2004. – № 11. – С. 385–390.
- ship with chemiluminescence's in washed semen. Hum Reprod. 1995; 10(1): 110–5.
10. Castellini C, Lattaioli P. Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. Anim Reprod Sci. 1999;57(1–2):115–20.
11. Colagar AH, Marzony ET. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. J Clin Biochem Nutr. 2009;45(2):144–9.
12. Li K, Li W, Huang Y. Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility. Clinica Chimica Acta. 2007;378(1–2):159–63.
13. Zaspel BJ, Csallany AS. Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1993;130(1):146–50.
14. Bland M. An introduction to medical statistics. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ Press; 2007. 405 p.
15. Bulavitskiy VM, Tal'ko WV. [Radio-stimulating effect of ionizing radiation on rat spermatozoa]. Problemy radiatsiinoi medytsyny ta radiobiologii. 2004;(11):385–90. Ukrainian.

Стаття надійшла до редакції 08.08.2013

Received: 08.08.2013