

## Влияние однократной дозы гамма-облучения на митохондриальное окисление в семенниках крыс

М.А. Аль Меселмани

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

*В работе показано, что на разных сроках после однократного внешнего низкодозового  $\gamma$ -облучения изменяется активность митохондриальной дыхательной цепи в ткани семенников на эндогенных и в присутствии экзогенных субстратов. Обнаружено разобщение процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях семенников. Установлено, что вызванные  $\gamma$ -облучением изменения энергетического обмена приводят к развитию тестикулярного окислительного стресса, что является основной причиной нарушения гормональной функции семенников и снижения фертильности. Морфологические исследования подтвердили наличие компенсаторно-приспособительных процессов и реакций восстановления в семенниках, что проявлялось в исчезновении отека стромы, восстановлении структуры сперматогенного эпителия.*

*Ключевые слова:* семенники, митохондрия, окисление, малые дозы  $\gamma$ -радиации, морфология, семенные каналцы, сперматогенный эпителий, белые крысы.

## Influence single dose of gamma irradiation on the mitochondrial oxidation in testis of rats

M.A. Almeselmani

Gomel State Medical University

**Summary.** *In the given works it is shown that external weak irradiation on different terms changes the activity of mitochondrial respiratory chain in tissues of the testis on endogenous and at presence of exogenous substrates with uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria of the testis. Change of energy metabolism induced by external irradiation leads to increase the testicular oxidative stress as the primary cause of hormonal function abnormality of the testis and decreased fertility. Morphological studies shows compensatory-adaptive processes and recovery reactions signs of the organ stroma swelling disappear in rat testes with recovery of spermatogenic epithelium.*

**Key words:** testis, mitochondria, oxidation, low doses  $\gamma$ -radiation, morphology, seminal ducts, spermatogenic epithelium, albino rats.

Развитие современных промышленных и научных технологий значительно повысило вероятность воздействия на организм человека низкоинтенсивного радиационного излучения, исходящего от различных источников проникающей радиации. Контингент людей, испытывающих на себе воздействие ионизирующего излучения в малых дозах, постоянно растет.

Литературные данные свидетельствуют об исключительно высокой чувствительности ткани семенников к любым видам радиационного облучения [2, 4, 5, 8]. Вместе с тем, сведения о влиянии внешнего облучения на митохондриальное окисление в сперматоцитах практически отсутствуют. Учитывая исключительно важную роль последнего для жизнедеятельности клеток и тканей [18], эти сведения могли бы служить основой для глубокого понимания особенностей патогенеза радиационного повреждения репродуктивной системы мужчин.

Ранее А.И. Грицук и соавт. [1] показали, что наиболее чувствительными к ионизирующему излучению структурами клеток являются митохондрии. Это обусловлено тем, что в митохон-

дриях протекают базовые процессы, обеспечивающие жизнедеятельность клетки. Также следует отметить значительное содержание ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных фосфолипидов митохондрий, окисление которых неизбежно отражается на агрегатном состоянии мембран.

Как показывают клинические и лабораторные наблюдения, интенсивность протекания процессов внутриклеточного дыхания во многом определяет функциональный статус тканей и внутренних органов. Доказано, что митохондриальная дисфункция лежит в основе большинства болезней человека [18]. У пациентов с митохондриальными заболеваниями, т.е. с нарушениями активности митохондриальной дыхательной цепи, выявлено уменьшение подвижности спермы в сочетании со спадом сперматоцитов при патогенных мутантах  $\Delta$ mtDNA [20].

Митохондрии общепризнанно являются главным местом образования активных форм кислорода (АФК) в клетках. При обычном уровне активности митохондрий 98% поступившего к ним кислорода используется для окисления субстра-

тов с образованием АТФ, а оставшиеся 2% – для синтеза АФК. Последние играют существенную роль в тонкой регуляции внутриклеточных биохимических реакций, в том числе протекающих и в семенниках [11]. АФК модифицируют функции сперматоцитов, способствуют повышению содержания антиоксидантов в семенной плазме. Получены данные, доказывающие важность роли митохондрий и, в частности, АФК в биосинтезе мужских половых гормонов [13]. Например, известно, что увеличение содержания АФК в сперматоцитах вызывает понижение уровня внутритестикулярного тестостерона [13]. Есть сведения об АФК-обусловленной индукции патологических изменений в мужской репродуктивной системе, а также возможности участия процессов, индуцируемых АФК, в развитии рака мочевого пузыря и простаты [11, 15].

Чрезмерное образование АФК может быть обусловлено как действием ионизирующего излучения, так и недостаточной активностью антиоксидантной защиты организма. Независимо от причины, вызвавшей ее, гиперпродукция АФК способствует формированию окислительного стресса с последующим закономерным повреждением сперматозоидов [16, 21].

В соответствии с представленными сведениями, с современных позиций функциональное состояние семенников принято оценивать, в первую очередь, по уровню активности митохондрий сперматоцитов, а степень повреждения митохондрий рассматривают в качестве индикатора выраженности дисфункции семенников.

Следует отметить, что помимо митохондриальных нарушений, реакция семенников на облучение может проявляться специфическими морфофункциональными изменениями, уменьшением показателей биоэнергетического метаболизма в них, снижением активности ферментов биоэнергетического обмена, гипопродукцией половых гормонов [2, 8].

Таким образом, анализ литературных данных дает представление о роли процессов митохондриального окисления в физиологических реакциях, обеспечивающих нормальный режим функционирования мужской репродуктивной системы. Влияние внешнего радиационного воздействия на организм в целом и ткань семенников в частности изучено достаточно хорошо. Тем не менее, каких-либо сведений о последствиях воздействия на семенники  $\gamma$ -облучения в малых дозах и особенностях протекания процессов митохондриального окисления в сперматоцитах после такого воздействия в литературных источниках обнаружено не было.

В связи с этим, целью исследования явилось изучение состояния митохондриального окисле-

ния в ткани семенников при воздействии на организм внешнего низкодозового  $\gamma$ -облучения.

**Материал и методы.** Опыты выполнены на 72 белых крысах-самцах весом 200–220 г. При выполнении опытов были соблюдены все требования нормативных актов, принятых в международной практике лабораторного эксперимента, – Хельсинкская декларация по гуманному обращению с животными (1975, пересмотр. в 1993 г.), директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, и используемых в экспериментальных и других научных целях (1986).

Всех животных однократно облучали с помощью установки «ИГУР-1» в дозах 0,5 Гр (мощность дозы 0,92 Гр/мин). Крыс делили на 6 групп: одна контрольная, т.е. без облучения (n=16), и пять опытных (облучавшиеся) групп – I, II, III, IV, V. Забой животных опытных групп проводили на 3-и сутки – I-я опытная группа (n=16), 10-е – II-я опытная группа (n=16), 40-е – III-я опытная группа (n=8), 60-е – IV-я опытная группа (n=8) и 90-е – V-я опытная группа (n=8).

Выделенные семенники охлаждали, промывали в физиологическом растворе хлорида натрия, освобождали от соединительной ткани и продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0,5 мм. В полученных кусочках ткани исследовали параметры митохондриального окисления полярографическим методом с использованием электрода Кларка в ячейке термостата объемом 2 мл при температуре 25С° [3]. Все эксперименты выполняли в условиях строгого контроля температуры и времени. Содержание белка в образцах определяли биуретовым методом после их гомогенизации [7].

Для оценки состояния тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (далее ТД и ОФ) определяли скорость поглощения кислорода кусочками ткани семенников на эндогенных ( $V_{\text{энд}}$ ) и экзогенных субстратах – 5мМ сукцината ( $V_{\text{як}}$ ) и 5мМ глутамата ( $V_{\text{глу}}$ ), а также в присутствии разобшителя ОФ – 2,4 динитрофенола ( $V_{\text{днф}}$ ) 100 мкМ. Также проводился ингибиторный анализ. В качестве ингибиторов использовали ингибитор I-го комплекса дыхательной цепи – амитал натрия ( $V_{\text{ам}}$ ) 1 мМ и ингибитор сукцинатдегидрогеназы – малонат натрия ( $V_{\text{мал}}$ ) 1 мМ. Скорость потребления кислорода в препаратах ткани семенников измеряли в нмоль  $O_2$ /мин/мг белка [1].

Наряду с этим рассчитывали величину стимулирующего влияния янтарной кислоты –  $СД_{\text{як}} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$ , глутамата –  $СД_{\text{глу}} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$  и 2,4-динитрофенола –  $СД_{\text{днф}} = V_{\text{днф}}/V_{\text{глу}}$ . Также рассчитывали показатели амиталрезистентного

дыхания –  $APD = V_{ам} / V_{энд}$  и малонатрезистентного дыхания –  $MPD = V_{мал} / V_{ам}$ . Данные показатели характеризуют соответственно интенсивность окисления флавопротеидзависимых субстратов и вклад жирных кислот (ЖК) в энергетический обмен на уровне исследуемой ткани. Перечисленные показатели ТД и ОФ позволяют в достаточной мере охарактеризовать состояние энергетического обмена в ткани [1].

Для морфологических исследований семенники крыс фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали парафином и готовили гистологические срезы толщиной 6–7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. В полученных срезах подсчитывали количество поперечно срезанных извитых семенных канальцев, определяли типы канальцев. Количественная оценка состояния сперматогенеза была проведена в 100 поперечно срезанных извитых канальцах семенников животных всех групп исследования.

По выраженности деструктивных процессов в сперматогенном эпителии извитые семенные ка-

нальцы делили на 5 типов. К I-му типу были отнесены извитые канальцы нормального строения с половыми клетками разной степени дифференцировки, располагающиеся концентрическими слоями в полном соответствии со стадиями развития. II-й, III-й и IV-й типы канальцев соответствовали различным стадиям патоморфологических изменений в семенниках по мере увеличения их деструкции. V-й тип канальцев характеризовал канальцы с незавершенным сперматогенезом, но без признаков дегенерации половых клеток [4].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерной программы Statistica for Windows 5.0.

**Результаты и их обсуждение.** Как было установлено, ткань семенников крыс отличалась высоким уровнем дыхательной активности митохондрий и повышенной чувствительностью к внешнему ионизирующему облучению (табл. 1).

Таблица 1

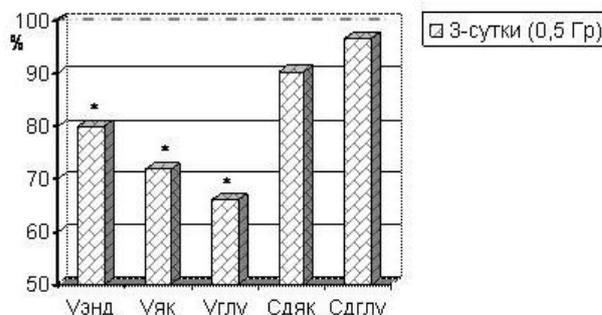
**Показатели митохондриального дыхания в ткани семенников крыс после однократного внешнего облучения (0,5 Гр) на 3-и и 10-е сутки**

Параметры	Сроки после облучения		
	Контроль	3 сутки	10 сутки
$V_{энд}$	3,19±0,02	2,55±0,09*	5,77±0,14*
$V_{як}$	5,32 ±0,31	3,82±0,22*	7,33±0,17*
$V_{глу}$	4,79 ±0,29	3,16±0,11*	8,32±0,07*
$V_{диф}$	6,31 ±0,16	4,31±0,15*	10,24±0,11*
$CD_{як}$	1,66± 0,10	1,50±0,06	1,27±0,01*
$CD_{глу}$	1,46±0,09	1,41±0,06	1,37±0,01
$CD_{диф}$	1,33±0,08	1,28±0,07	1,21±0,03

Примечание – здесь и далее достоверность различий по отношению к контрольной группе: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

На 3-и сутки после облучения наблюдали достоверное снижение скорости дыхания в ткани семенников на эндогенных субстратах до 2,55±0,09 нмоль  $O_2$ /мин/мг против 3,19±0,02 нмоль  $O_2$ /мин/мг в контроле. Сходную динамику изменений отмечали и при использовании экзогенных субстратов – сукцината и глутамата. В этих условиях наблюдали достоверное снижение скорости дыхания митохондрий при использовании сукцината до 3,82±0,22, глутамата – до 3,16±0,11 нмоль  $O_2$ /мин/мг соответственно против 5,32 ±0,31 и 4,79 ±0,29 нмоль  $O_2$ /мин/мг в контроле (рис. 1). Обнаруженное на 3-и сутки снижение дыхательной активности семенников могло быть обусловлено развитием деструктивных процессов, вызванных радиационным воздействием. Следствием этого могло явиться снижение эндогенного

пула субстратов, в частности, сукцината и глутамата, что было подтверждено уменьшением ко-



**Рис. 1. Показатели митохондриального дыхания в ткани семенников на 3-и сутки после общего облучения (0,5 Гр).**

эффициентов  $СД_{\text{як}}$  и  $СД_{\text{глу}}$  (табл. 1).

Наблюдавшаяся метаболическая картина подтвердила наличие разобщения ОФ в митохондриях сперматоцитов, что проявилось достоверным снижением коэффициента  $СД_{\text{днф}}$  с  $1,33 \pm 0,08$  до  $1,28 \pm 0,07$ . Было высказано предположение, что в этом случае разобщителями процесса ОФ могли явиться образующиеся при липолизе триацилглицеридов и фосфолипидов свободные ЖК [14, 22]. Феномен разобщения ОФ, отмеченный в опытах на изолированных митохондриях различ-

ных тканей, принято считать характерным признаком раннего пострадиационного периода [1].

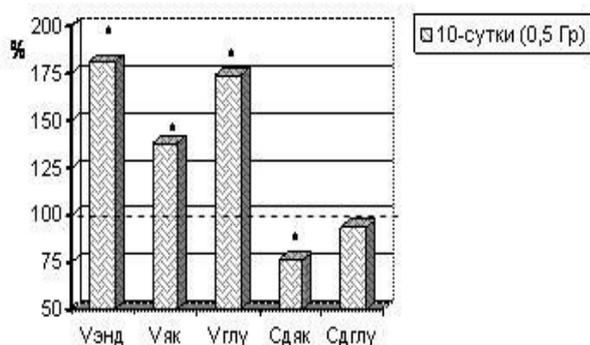
Результаты опытов с применением специфических ингибиторов – амитала натрия (АМ) и малоната натрия (МАЛ) – позволили выявить снижение скорости тканевого дыхания в семенниках при окислении данных субстратов. Так, отмечалось достоверное снижение  $V_{\text{ам}}$  и  $V_{\text{мал}}$  с  $2,53 \pm 0,34$  и  $2,15 \pm 0,31$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в контроле соответственно до  $1,57 \pm 0,08$  и  $0,83 \pm 0,05$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние ингибиторов на тканевое дыхание в семенниках крыс после однократного общего облучения (0,5 Гр) на 3-и и 10-е сутки**

Параметры	Сроки после облучения		
	Контроль	3 сутки	10 сутки
$V_{\text{энд}}$	$3,34 \pm 0,43$	$2,39 \pm 0,17^*$	$5,89 \pm 0,42^*$
$V_{\text{ам}}$	$2,53 \pm 0,34$	$1,57 \pm 0,08^*$	$4,92 \pm 0,32^*$
$V_{\text{мал}}$	$2,15 \pm 0,31$	$0,83 \pm 0,05^*$	$3,71 \pm 0,25^*$
АРД	$0,77 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,02^*$
МРД	$0,85 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,01^*$	$0,75 \pm 0,01^*$

На 10-е сутки после облучения метаболическая ситуация в ткани семенников резко изменялась – ослабление тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования сменялось активацией этих процессов. В частности, скорость дыхания препаратов семенников на эндогенных субстратах возрастала с  $3,19 \pm 0,02$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в контроле до  $5,77 \pm 0,14$ . В присутствии экзогенных субстратов (сукцинат, глутамат) также отмечали увеличение дыхательной активности митохондрий с  $5,32 \pm 0,31$  и  $4,79 \pm 0,29$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в контроле соответственно до  $7,33 \pm 0,17$  и  $8,32 \pm 0,07$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  (табл. 1, рис. 2).



**Рис. 2. Показатели митохондриального дыхания в ткани семенников крыс на 10-е сутки после общего облучения (0,5 Гр).**

Также на этом этапе опыта отмечали увеличение скорости тканевого дыхания в присутствии разобщителя ОФ 2,4-динитрофенола с  $6,31 \pm 0,16$  в контроле до  $10,24 \pm 0,11$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  (табл. 2).

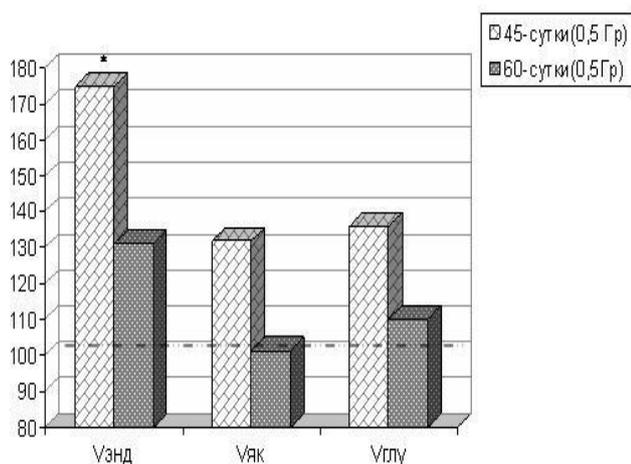
На 40-е и 60-е сутки наблюдения тканевое дыхание в ткани семенников на эндогенных и экзогенных субстратах заметно усиливалось, особенно на 40-е сутки. Так, отмечалась активация эндогенного дыхания с  $5,62 \pm 0,55$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в контроле до  $9,82 \pm 1,34$  (40-е сутки) и  $7,37 \pm 1,00$  (60-е сутки) нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  (табл. 3).

Близкие по характеру изменения были обнаружены при использовании экзогенных субстратов (сукцинат, глутамат) – на 40-е сутки после облучения наблюдали увеличение скорости окисления сукцината ( $V_{\text{як}}$ ) до  $13,09 \pm 3,46$ , а глутамата ( $V_{\text{глу}}$ ) – до  $11,02 \pm 1,11$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в сравнении с  $9,94 \pm 1,15$  и  $8,10 \pm 0,37$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в контроле. Отмечено, что  $V_{\text{як}}$  60-е сутки после облучения возросла до  $10,08 \pm 0,83$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  (рис. 3).

Как видно из табл. 3, на 90-е сутки после однократного облучения на эндогенных и экзогенных субстратах отмечалось нарастание скорости митохондриального дыхания. В частности, наблюдали достоверное увеличение эндогенного дыхания с  $3,19 \pm 0,02$  нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  в контроле до  $6,06 \pm 0,47$ .

**Показатели митохондриального дыхания в ткани семенников крыс после однократного внешнего облучения (0,5 Гр) на 40-е, 60-е и 90-е сутки**

Параметры	Сроки после облучения			
	Контроль	40 сутки	60 сутки	90 сутки
$V_{энд}$	5,62±0,55	9,82±1,34*	7,37±1,00	6,06 ±0,47*
$V_{як}$	9,94 ±1,15	13,09±3,46	10,08±0,83	7,94±0,67*
$V_{глу}$	8,10±0,37	11,02±1,11	8,91±0,64	7,96±0,87*
$V_{днф}$	9,22 ±0,20	12,04±1,27	9,55±1,16	9,75±1,11*
$СД_{як}$	2,11± 0,27	1,42±0,17	1,63±0,32	1,31±0,06*
$СД_{глу}$	1,42± 0,10	1,21±0,02*	1,28±0,05	1,26±0,02*
$СД_{днф}$	1,21±0,08	1,09±0,02	1,11±0,04	1,23±0,04

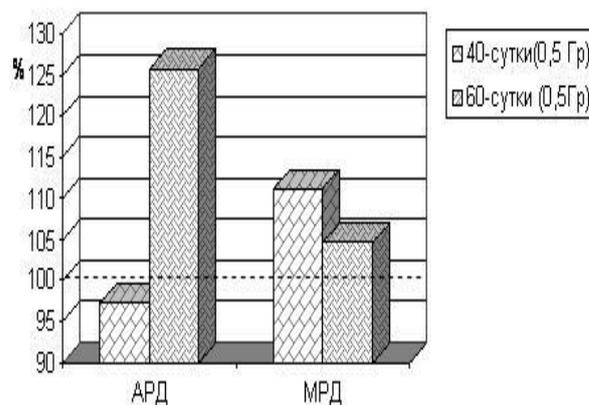


**Рис. 3. Показатели митохондриального дыхания в ткани семенников крыс на 40-е и 60-е сутки после общего облучения (0,5 Гр).**

Как видно из табл. 3, на 90-е сутки после однократного облучения на эндогенных и экзогенных субстратах отмечалось нарастание скорости митохондриального дыхания. В частности, наблюдали достоверное увеличение эндогенного дыхания с  $3,19 \pm 0,02$  нмоль  $O_2$ /мин/мг в контроле до  $6,06 \pm 0,47$ .

Сходные изменения скорости дыхания на 90-е сутки были обнаружены при использовании экзогенных субстратов – сукцината, глутамата. В частности,  $V_{як}$ ,  $V_{глу}$  достоверно возрастали с  $5,32 \pm 0,31$  и  $4,79 \pm 0,22$  нмоль  $O_2$ /мин/мг в контроле соответственно до  $7,94 \pm 0,67$  и  $7,96 \pm 0,87$  нмоль  $O_2$ /мин/мг. Кроме того, отмечено заметное увеличение скорости дыхания в присутствии 2,4-динитрофенола с  $6,31 \pm 0,16$  нмоль  $O_2$ /мин/мг в контроле до  $9,75 \pm 1,11$  (табл. 3).

Показатели коэффициентов стимулирующего действия сукцината и глутамата демонстрировали достоверное снижение.  $СД_{як}$  и  $СД_{глу}$  уменьшались с  $1,66 \pm 0,10$  и  $1,46 \pm 0,09$  в контроле соответственно до  $1,31 \pm 0,06$  и  $1,26 \pm 0,02$ . Это свидетель-



**Рис. 4. Влияние ингибиторов на тканевое дыхание в семенниках крыс на 40-е и 60-е сутки после однократного внешнего облучения (0,5 Гр).**

ствовало об увеличении содержания эндогенного сукцината в составе митохондрий и повышении активности сукцинатдегидрогеназы, что обеспечивает прирост внутримитохондриального пула сукцината и глутамата в облученных семенниках. По нашему мнению, снижение  $СД_{днф}$  с  $1,33 \pm 0,08$  в контроле до  $1,23 \pm 0,04$  на этой стадии эксперимента подтверждает факт наличия разобщения процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях семенников.

Результаты ингибиторного анализа (табл. 4), с одной стороны, выявляли достоверный рост активности тканевого дыхания в семенниках крыс в ответ на облучение, что свидетельствовало о стимулирующем влиянии малых доз радиации. С другой стороны, было отмечено усиление процессов  $\beta$ -окисления жирных кислот и FAD-зависимого дыхания, что подтверждалось достоверным увеличением коэффициента АРД с  $0,72 \pm 0,04$  в контроле до  $0,89 \pm 0,02$ . На 40-е и 60-е сутки изменения метаболизма янтарной кислоты в препаратах семенников демонстрировали лишь тенденции формирующихся изменений протекания процессов ОФ в ми-

тохондриях, в сочетании с активацией процессов окисления ЖК, что проявлялось в увеличении показателей  $V_{ам}$  и  $V_{мал}$ . Следует отметить, что снижение интенсивности МРД с  $0,85 \pm 0,02$  в контроле до  $0,63 \pm 0,04$  на 90-е сутки после облучения можно толковать в пользу увеличения чувствительности сукцинатдегидрогеназы к малонату.

Как мы полагаем, снижение показателя  $СД_{лнф}$  у животных контрольной группы с  $1,21 \pm 0,08$  до  $1,09 \pm 0,02$  и до  $1,11 \pm 0,04$  у животных опытной группы соответственно на 40-е и 60-е сутки после облучения указывает на разобщение в системе сопряжения ОФ митохондрий (табл. 3).

Рост показателей АРД и МРД на 60-е сутки после облучения до  $0,80 \pm 0,02$  и  $0,69 \pm 0,06$  соответственно по сравнению с  $0,72 \pm 0,04$  и  $0,66 \pm 0,02$  в контроле свидетельствует также о формировании сдвигов в системе FAD-зависимого дыхания. Однако существенный рост коэффициента МРД на этом фоне характеризует особую значимость ЖК для энергетики семенников (рис. 4). Принимая во внимание важную роль ЖК в энергообеспечении активно функционирующих тканей семенников, отметим, что такое повышение зачатую может сопровождаться значительным спадом эффективности энергетического обмена.

Таблица 4

**Влияние ингибиторов на тканевое дыхание в семенниках крыс после однократного внешнего облучения (0,5 Гр) на 40-е и 60-е сутки**

Параметры	Сроки после облучения			
	Контроль	40-е сутки	60-е сутки	90-е сутки
$V_{энд}$	$5,77 \pm 0,24$	$10,17 \pm 0,65^*$	$7,39 \pm 0,39^{**}$	$6,20 \pm 0,23^*$
$V_{ам}$	$4,15 \pm 0,22$	$6,92 \pm 0,46^{**}$	$6,57 \pm 0,39^{**}$	$5,54 \pm 0,32^*$
$V_{мал}$	$2,74 \pm 0,15$	$5,67 \pm 0,22^{**}$	$5,04 \pm 0,49^{**}$	$3,49 \pm 0,36^*$
АРД	$0,72 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,02^*$
МРД	$0,66 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,06^*$	$0,69 \pm 0,06$	$0,63 \pm 0,04^*$

Как было установлено, нарушения митохондриального окисления в семенниках крыс после их облучения в дозе 0,5 Гр проявляются в характерных морфологических изменениях. В ходе

изучения срезов семенников было обнаружено достоверное снижение в них количества извитых канальцев. Также изменялось соотношение между канальцами I–IV типов (табл. 5).

Таблица 5

**Процентное содержание семенных канальцев с различной степенью нарушения сперматогенеза в семенниках крыс через 3, 10 и 90 суток после однократного общего облучения (0,5 Гр)**

№ гр.	Количество канальцев в поле зрения (%) ув. $10 \times 10$	Процентное содержание извитых канальцев I типа	Процентное содержание извитых канальцев II типа	Процентное содержание извитых канальцев III типа	Процентное содержание извитых канальцев IV типа	Процентное содержание извитых канальцев V типа
К	$40,50 \pm 0,55$	$77,00 \pm 2,87$	$20,50 \pm 0,98$	$1,90 \pm 0,36$	$0,60 \pm 1,10$	0
I	$28,30 \pm 0,75^*$	0	$2,75 \pm 0,10^*$	$95,75 \pm 1,55^*$	$1,50 \pm 0,05$	0
II	$28,70 \pm 0,28^*$	$2,00 \pm 0,56^*$	$6,75 \pm 0,87^*$	$86,25 \pm 2,25^*$	$5,00 \pm 0,48$	0
V	$40,10 \pm 0,57$	$25,50 \pm 0,85^*$	$49,25 \pm 2,58^*$	$14,25 \pm 1,67^*$	$9,00 \pm 0,17^*$	$2,00 \pm 0,09$

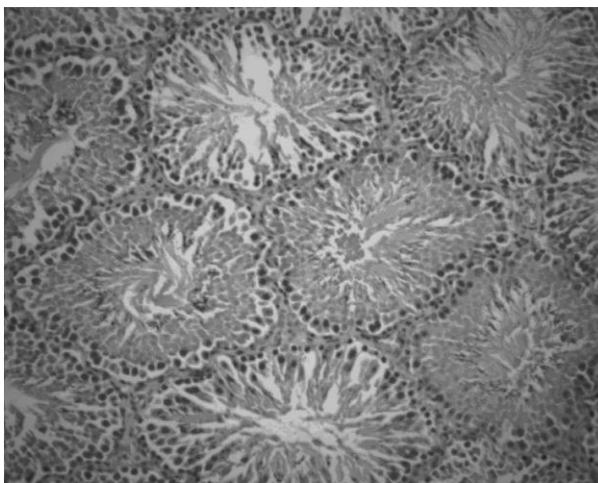
\* – достоверно по отношению к контролю ( $p \leq 0,05$ );

К – контроль, I, II, V – опытные группы.

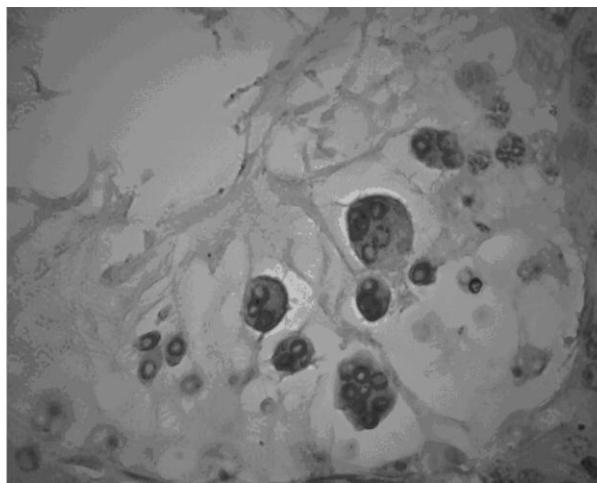
Исследования показали, что через 3 и 10 дней с момента однократного облучения крыс в дозе 0,5 Гр (I, II группы) в семенниках достоверно снижалось количество извитых канальцев (табл. 5). Через 90 суток после облучения (V группа) количество семенных канальцев восстанавливалось и практически не отличалось от контроля –  $40,50 \pm 0,55$ . Снижение количества семенных канальцев в I-й и II-й группах животных, по-видимому, было вызвано развитием отека межканальцевой стромы. Наблюдения показали, что при развитии отека стромы семенников происходит разъединение извитых канальцев, которые в срезах располагаются группами или же изолиро-

ванно. Сосуды в семенниках при этом выглядят расширенными и полнокровными.

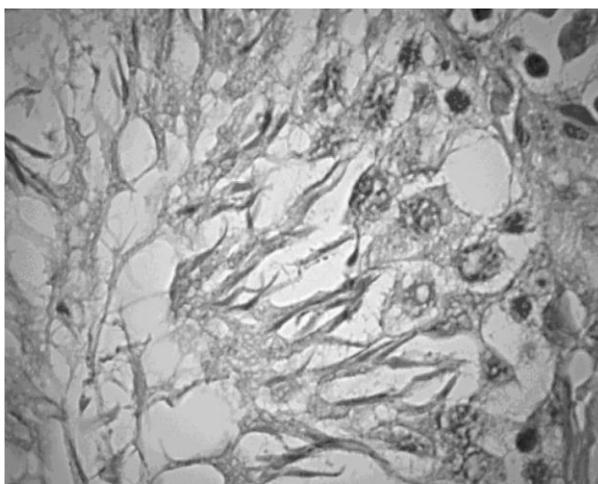
Заметные изменения состояния сперматогенного эпителия канальцев выявлялись уже на 3-и сутки после облучения. Как видно из табл. 5, в семенниках крыс I-й группы обнаруживаются извитые канальцы II, III и IV типов, но практически отсутствуют канальцы нормального строения, т.е. I тип. На 4-е сутки после облучения большинство канальцев семенников крыс имели серьезные повреждения сперматогенного эпителия (III тип) – 95,7% против 1,9% в контроле (рис. 5, 1).



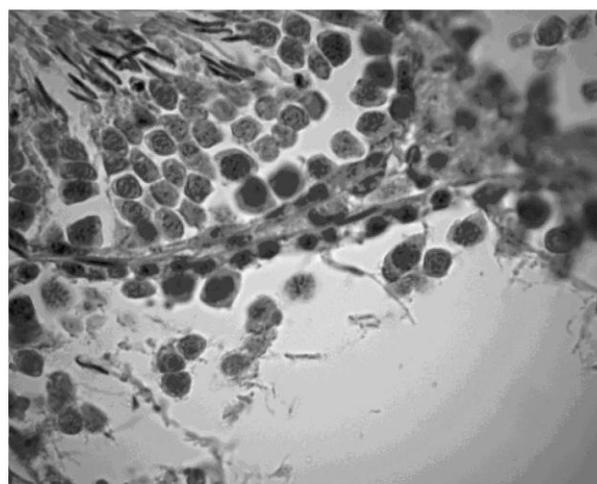
1. Срез ткани семенников животных контрольной группы (ув. 15×10)



2. «Семенные шары» в стенке семенного канальца III типа (ув. 15×40)



3. Сперматогенный эпителий с признаками дегенерации большого количества половых клеток – каналец III типа (ув. 15×40)



4. Стенка семенного канальца с незавершенным сперматогенезом без признаков дегенерации половых клеток – каналец V типа (ув. 15×40)

Рис. 5. Морфологические изменения в гистологических препаратах семенников крыс после однократного общего облучения (0,5 Гр).

Морфологически в канальцах III-го типа в основной массе сперматид и сперматоцитов присутствовали признаки дегенерации (рис. 5, 3). В этих клетках, как правило, обнаруживали множественную вакуолизацию цитоплазмы. В отдельных половых клетках наблюдали гиперхромность ядра, в большинстве – отмечали признаки лизиса. Между клетками сперматогенного эпителия границы утрачивали четкость. Многие клетки, утратив связь с поддерживающими клетками, сустентоцитами, выпадали в просвет канальцев, где вследствие лизиса теряли ядерный аппарат. Такие изменения могли быть обусловлены влиянием радиации на межклеточные контакты сперматогенного эпителия [10]. В эпителии канальцев на месте погибших сперматоцитов обнаруживались полости округлой формы. В ряде случаев наблюдали заполнение просветов извитых канальцев III типа клеточным детритом, состоящим из погибших сперматозоидов, сперматогоний и сперматоцитов. В некоторых канальцах наблюдали крупные структуры – «семенные шары», с множественными, часто пикнотичными ядрами или их фрагментами и интенсивно окрашенной цитоплазмой (рис. 5, 2). «Семенные шары», как известно, образуются за счет слияния сперматид в сперматогенном эпителии с последующим их отторжением в просвет канальцев [6].

Несмотря на высокую устойчивость эпителиальных клеток сперматогенного эпителия к радиации по сравнению с мужскими половыми клетками [17, 19], в некоторых канальцах III-го типа наблюдали изменения со стороны сустентоцитов. Большинство сустентоцитов теряли часть своей цитоплазмы, которая отторгалась в просвет канальцев вместе с дегенеративно изменившимися сперматоцитами, сперматидами и сперматозоидами. Часть клеток сперматогенного эпителия оставалась прикрытой цитоплазмой поддерживающих клеток, что важно для реализации их барьерной функции.

Ко II-му типу канальцев были отнесены канальцы с признаками легкого нарушения сперматогенеза в отдельных клетках. Деструктивные изменения в этих канальцах проявлялись, прежде всего, в изменении ядерного аппарата мужских половых клеток (кариорексис, кариопикноз, кариолизис).

Процентное содержание канальцев II-го типа у крыс контрольной группы составило 20,5%. На 4-е сутки после облучения животных их количество достоверно снижалось в сравнении с контролем и составило 2,7%.

Спустя 10 суток с момента облучения животных в срезах семенников крыс находили каналь-

цы 4-х типов – I, II, III и IV. Однако, как видно из табл. 3, канальцы с нормальным строением (I тип) и с признаками легкого нарушения сперматогенеза (II тип) встречались реже, чем в группе контроля. Так, у животных II-й группы канальцы I типа составляли лишь 2,0% против 77,0% в контрольной группе. Процент канальцев II типа у животных II-й группы составил 6,7%. Таким образом, процент канальцев с признаками легких нарушений сперматогенеза у животных II-й группы несколько превышал таковой для I-й группы, но оставался достоверно ниже контроля.

Следует отметить, что даже спустя 10 суток после облучения животных в срезах семенников преобладали канальцы III типа. У крыс данной группы их количество составило 86,2%. Однако, как видно из табл. 3, количество канальцев III типа все же несколько уменьшалось по сравнению с их содержанием у животных, забитых на 4-е сутки после облучения. Появление в срезах семенников животных II-й группы канальцев с нормальным строением (I тип), некоторое увеличение количества канальцев II типа, снижение количества канальцев III типа по сравнению с животными I-й группы свидетельствовали о возникновении тенденции к улучшению состояния сперматогенного эпителия семенников.

Спустя 90 суток с момента облучения (крысы V-й группы) морфологическая картина менялась более заметно. Несмотря на то, что в срезах семенников крыс обнаруживались канальцы всех типов (табл. 3), канальцы I и II типов составляли подавляющее большинство. Однако в отличие от контрольной группы, в семенниках животных V-й группы достоверно преобладали канальцы II типа (49,2%). Процентное содержание канальцев I типа у животных на этом этапе опыта возросло до 25,5%, но по-прежнему было достоверно ниже, чем в контроле. Процентное содержание канальцев III типа было достоверно выше, чем в контрольной группе, но значительно уступало их количеству у животных I-й и II-й групп. Для крыс V-й группы оно составило 14,2%. Следует отметить, что спустя 90 суток с момента облучения наблюдалось значительное увеличение числа канальцев IV типа. Оно составило 9,0% против 0,6% в контроле. К канальцам IV типа были отнесены опустошенные извитые семенные канальцы с диаметром в 2–3 раза меньше диаметра канальцев других типов. В некоторых канальцах IV типа пристеночно сохранялась часть сустентоцитов с небольшим количеством сперматогоний, однако поддерживающие клетки были лишены большей части своей

цитоплазмы и несколько уплощены. По сравнению с контролем достоверное увеличение в семенниках крыс V-й группы процентного содержания канальцев IV типа, на наш взгляд, свидетельствует об углублении дистрофических и деструктивных изменений в клетках сперматогенного эпителия в отдаленные сроки с момента облучения животных в дозе 0,5 Гр.

Известно, что появление канальцев V типа (канальцы с незавершенным сперматогенезом, но без признаков дегенерации половых клеток) является подтверждением начала восстановительных процессов в семенниках [9]. В наших опытах у животных I-й и II-й групп канальцы данного типа отсутствовали. Через 90 суток с момента облучения (V группа) канальцы V типа в семенниках составляли уже 2,0% (рис. 5, 4). На основании этого можно высказать предположение об активации в период с 10-х по 90-е сутки после облучения компенсаторно-приспособительных процессов и восстановительных реакций в семенниках. Тем не менее, все же следует отметить, что у животных V-й группы восстановление сперматогенного эпителия канальцев семенников не достигало контрольных показателей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности ткани семенников к действию даже малых доз  $\gamma$ -облучения, что проявляется в дестабилизации процессов тканевого дыхания в митохондриях клеток сперматогенного эпителия. Последнее находит отражение в нарушении энергетического обмена, что, в свою очередь, приводит к возникновению в семенниках крыс специфических морфологических изменений.

#### **Заключение.**

1. Анализ полученных данных в настоящей работе свидетельствует о высокой чувствительности митохондриального окисления ткани семенников к действию однократной дозы гамма-излучения, которые проявляются в виде изменения параметров дыхания, кислот, разобщения в системе сопряжения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках.

2. Сперматогенный эпителий извитых семенных канальцев крыс обладает высокой чувствительностью даже к однократному воздействию ионизирующего облучения в дозе 0,5 Гр, что проявляется в специфических нарушениях структуры эпителия канальцев уже на 3-и сутки после облучения.

3. Наиболее выраженные патоморфологические изменения в семенниках крыс наблюдаются в период с 3 по 10-е сутки после однократного облучения в указанной дозе.

4. Включение компенсаторно-приспособительных реакций и начало процессов восстановления поврежденных  $\gamma$ -излучением клеточных и субклеточных структур семенников крыс происходит спустя 10 суток после низкодозового облучения.

5. Через 90 суток с момента облучения животных в дозе 0,5 Гр в семенниках исчезают признаки отека стромы, происходит частичное восстановление поврежденного радиацией сперматогенного эпителия.

#### *ЛИТЕРАТУРА*

1. Гризук А.И., Матюхина Т.Г., Коваль А.Н. и др. // *Авиакосм. и экол. медицина.* – 2002. – № 4. – С. 50–55.
2. Карпенко Н.А. // *Радиац. биология. Радиэкология.* – 2000. – Т. 40, № 1. – С. 86–91.
3. Кондрашова М.Н., Ананенко А.А. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом.* – М., 1973. – С. 106–119.
4. Конопля Е.Ф., Верещако Г.Г., Артеменко О.В. // *Радиац. биол. и радиэкология.* – 2003. – № 2. – С. 221–222.
5. Конопля Е.Ф., Верещако Г.Г., Ходосовская А.М. // *Радиация и Чернобыль. Ближайшие и отдаленные последствия.* – Гомель, 2007. – С. 105–110.
6. Котовский Е.Ф., Шатманов С.Т. // *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* – 1985. – Т. 99, № 5. – С. 626–628.
7. Кочетков Г.А. *Практическое руководство по энзимологии.* – М., 1980. – 220 с.
8. Попов Е.Г., Конопля Е.Ф., Бансцин Н.В. // *Радиац. биология. Радиэкология.* – 2005. – Т. 45, № 1. – С. 46–50.
9. Семенов Н.В. // *Антибиотики.* – 1984. – Т. 29, № 9. – С. 666–671.
10. Троян Э.И.: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2000. – 20 с.
11. Aitken R.J., Ryan A.L., Curry B.J. and Baker M.A. *Molecular Human Reproduction.* – 2003. – Vol. 9, № 11. – P. 645–661.
12. Allamaneni S.S., Naughton C.K., Sharma R.K. et al. // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82, № 6. – P. 1684–1686.
13. Andrew S.I., Liu J., Zirkin B.R., Chen H. // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148, № 6. – P. 2583–2590.
14. Branka D., Vesna S., Vesna S.-J. // *Arch. Oncol.* – 2004. – Vol. 12, № 4. – P. 197–199.
15. Chaki S.P., Misro M.M., Ghosh D. et al. // *Apoptosis.* – 2005. – Vol. 10, № 2. – P. 395–405.
16. Ford W.C. // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 387–399.
17. Hasegawa M., Wilson G., Russell M.L., Meistrich L.D. // *Radiat. Res.* – 1997. – I. 147. – P. 457–467.
18. Hüttemann M.I. et al. // *J. Bioenerg Biomembr.* – 2008. – Vol. 40, № 5. – P. 445–456.
19. Liu G.W., Gong P.S., Zhao H.G. et al. // *Radiat. Res.* – 2006. – I. 165. – P. 379–389.
20. Sun Z.M. et al. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi: study of 151 cases.* – 2007. – Vol. 87. – P. 1263–1265.
21. Williams A.C., Ford W.C. // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol. 83, № 4. – P. 929–932.
22. Yukawa O., Nakajima T., Yukawa M. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75. – P. 1189–1199.

*Поступила в редакцию 19.05.2010*

*Адрес для корреспонденции:* г. Гомель, ул. Ланге, д. 5, УО «ГТМУ», e-mail: drmouhand78@inbox.ru – Аль Меселмани М.А.