

УДК 57.04 + 591.463.1

Г. Г. ВЕРЕЩАКО, Н. В. ЧУЕШОВА, Г. А. ГОРОХ, А. Д. НАУМОВ

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕШНЕГО ОБЛУЧЕНИЯ И ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС-САМЦОВ

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, e-mail: vereschako2@tut.by

(Поступила в редакцию 06.11.2014)

Введение. Различные факторы окружающей среды (физические, химические, психо-эмоциональные) могут оказывать негативное влияние на организм, которое реализуется в рамках неспецифического адаптационного синдрома. В экспериментах при изучении влияния стресса на организм широко используется модель иммобилизационного стресса. Однако в реальных условиях действие экстремальных факторов окружающей среды нередко носит комбинированный характер. Например, в ряде регионов после крупнейших радиационных катастроф (Чернобыль, Фукусима) сохраняется сложная радиоэкологическая обстановка, где ионизирующая радиация выступает в качестве стресс-фактора наряду с другими внешними факторами.

В связи с этим представляется актуальным изучить комбинированное действие ионизирующего излучения и иммобилизационного стресса на репродуктивную систему самцов млекопитающих, которая является одной из наиболее чувствительных систем организма к негативным воздействиям.

Оценке состояния репродуктивной системы самцов при действии различных видов ионизирующих излучений посвящено немало исследований [1–3]. Что касается иммобилизационного стресса, то следует отметить, что за последнее время появился ряд публикаций, в которых приводятся данные о структурно-функциональных нарушениях в ткани семенника, эпидидимальных сперматозоидах при обездвиживании животных [4–7]. В то же время практически отсутствуют работы, касающиеся состояния репродуктивной системы самцов при комбинированном действии облучения и иммобилизационного стресса.

Цель работы – изучение влияния внешнего облучения в дозе 0,5 Гр и иммобилизационного стресса, а также их комбинированного действия на морфофункциональное состояние репродуктивной системы крыс-самцов в различные сроки после воздействия этих факторов.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на крысах-самцах стадного разведения (исходный возраст 3,5 мес.), которых содержали в стандартных условиях вивария. Все животные были разделены на 4 группы: 1 – контроль (интактные животные); 2 – крысы, облученные в дозе 0,5 Гр; 3 – животные, подвергнутые иммобилизационному стрессу; 4 – крысы-самцы, облученные в дозе 0,5 Гр, которых затем подвергали иммобилизационному стрессу.

Внешнее однократное облучение животных в дозе 0,5 Гр проводили на установке ИГУР (^{137}Cs , мощность дозы 43 сГр/мин). На следующие сутки после радиационного воздействия животных подвергали иммобилизационному стрессу, который вызывали путем помещения крыс в стандартные индивидуальные пластиковые пеналы (фиксаторы, $d = 5,5$ см) для обездвиживания по 3 ч ежедневно на протяжении 7 сут. Эксперименты выполняли на 1-е и 30-е сутки после иммобилизационного стресса и комбинированного (облучение + иммобилизационный стресс) воздействия, а также на 8-е и 37-е сутки после облучения в дозе 0,5 Гр.

Перед опытами оценивали массу животных, после декапитации производили забор крови, извлекали семенники с придатками, которые взвешивали для последующего расчета их относительной массы. В клеточной суспензии, полученной из тестикулярной ткани, проводили количественный анализ различных типов сперматогенных клеток методом ДНК-проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США) при длине волны 488 нм [8]. По содержанию ДНК сперматогенные клетки были классифицированы как сперматогонии (2С), сперматоциты первого порядка (4С), сперматоциты в S-фазе, круглые (1С), удлинённые (НС1) и продолговатые сперматиды (НС2). Из эпидидимиса выделяли зрелые половые клетки, число которых подсчитывали в камере Горяева [9]. В эпидидимальных сперматозоидах определяли жизнеспособность с помощью окрашивания эозин-нигрозинном [10], а также индекс DFI (индекс фрагментации ДНК) [11]. В сыворотке крови с помощью наборов ИФА определяли также содержание тестостерона («Хема», Россия).

Контролем служили интактные крысы-самцы аналогичного возраста. Результаты исследований обрабатывали статистически общепринятыми методами с вычислением степени достоверности с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что облучение крыс-самцов в дозе 0,5 Гр на 8-е и 37-е сутки не вызывает достоверного изменения массы тела и органов репродуктивной системы (табл. 1). Имобилизация животных и комбинированное действие облучения и иммобилизационного стресса сопровождается достоверным увеличением абсолютной массы семенников на 1-е сутки после воздействия. Спустя 30 сут после иммобилизационного стресса сохраняется повышенная абсолютная масса семенников и, кроме того, выявляется достоверное увеличение абсолютной массы эпидидимисов (+ 13,1 %). Увеличение абсолютной массы органов репродуктивной системы самцов, вероятно, связано с возникновением локальных отеков в этих органах [4].

Т а б л и ц а 1. Изменение массы тела и массы органов репродуктивной системы крыс-самцов в различные сроки после облучения в дозе 0,5 Гр, иммобилизационного стресса (ИС) и их комбинированного воздействия (0,5 Гр + ИС)

Серия опытов	Масса тела, г	Абсолютная масса семенников, г	Относительная масса семенников, %	Абсолютная масса эпидидимисов, г	Относительная масса эпидидимисов, %
<i>1-е сутки</i>					
Контроль	269,8 ± 16,7	1,39 ± 0,04	0,52 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,16 ± 0,01
0,5 Гр**	266,6 ± 9,4	1,36 ± 0,05	0,51 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,16 ± 0,01
ИС	284,0 ± 10,3	1,58 ± 0,05*	0,56 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,17 ± 0,01
0,5 Гр + ИС	297,8 ± 9,50	1,55 ± 0,05*	0,52 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,15 ± 0,01
<i>30-е сутки</i>					
Контроль	313,4 ± 17,0	1,38 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,15 ± 0,01
0,5 Гр***	321,0 ± 10,5	1,35 ± 0,05	0,43 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,15 ± 0,01
ИС	324,4 ± 18,4	1,65 ± 0,06*	0,53 ± 0,05	0,52 ± 0,01*	0,16 ± 0,01
0,5 Гр + ИС	337,5 ± 14,7	1,32 ± 0,07	0,40 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,15 ± 0,01

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий: * – при $p < 0,05$; ** – на 8-е сутки после облучения, *** – на 37-е сутки после облучения. То же для табл. 2.

Количественный анализ популяции сперматогенных клеток в тестикулярной ткани после облучения в дозе 0,5 Гр (8-е сутки) показывает тенденцию к снижению количества сперматогоний, сперматоцитов первого порядка, продолговатых и удлинённых сперматид и повышению числа других форм клеток (круглые сперматиды и сперматоциты в S-фазе). Несмотря на то что при иммобилизационном стрессе дисбаланс числа клеток различных стадий дифференцировки на 1-е сутки после воздействия по сравнению с контролем значительный, он не носит достоверного характера. Максимальные отклонения количества сперматогенных клеток различных стадий дифференцировки наблюдаются в этот период при комбинированном действии облучения и иммобилизационного стресса, когда отмечается достоверный рост числа сперматоцитов в S-фазе (+ 42,8 %) и продолговатых сперматид (более чем в 2 раза), существенное падение числа удлинённых сперматид (–45,3 %), сперматогоний (–19,3 %) и сперматоцитов первого порядка (–16,4 %) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Изменение количества сперматогенных клеток различных стадий дифференцировки в ткани семенниках крыс-самцов после облучения в дозе 0,5 Гр, иммобилизационного стресса (3 ч/сут в течение 7 сут) и их комбинированного воздействия

Серия опытов	Сперматогенные клетки, %					
	Сперматогонии (2С)	Сперматоциты		Сперматиды		
		первого порядка (4С)	в S-фазе	круглые (1С)	удлиненные (НС1)	продолговатые (НС2)
<i>1-е сутки</i>						
Контроль	15,34 ± 1,39	6,91 ± 1,32	2,81 ± 0,14	42,94 ± 2,15	16,47 ± 1,66	9,83 ± 1,23
0,5 Гр**	14,14 ± 1,48	5,75 ± 0,64	3,17 ± 0,35	47,71 ± 2,12	14,61 ± 1,50	7,10 ± 0,83
ИС	12,60 ± 1,50	7,43 ± 0,68	3,68 ± 0,66	39,59 ± 1,64	14,18 ± 2,31	11,64 ± 2,13
0,5 Гр + ИС	12,38 ± 0,65	5,78 ± 0,41	4,01 ± 0,43*	37,68 ± 3,29	9,01 ± 1,02*	22,86 ± 1,60*
<i>30-е сутки</i>						
Контроль	11,26 ± 0,67	3,50 ± 0,29	3,26 ± 0,27	36,49 ± 0,44	14,25 ± 0,81	27,27 ± 0,99
0,5 Гр***	10,21 ± 0,70	2,32 ± 0,16*	2,65 ± 0,06*	29,90 ± 0,82*	24,00 ± 1,59*	26,86 ± 0,97
ИС	11,38 ± 0,59	4,31 ± 0,58	3,73 ± 0,18	44,35 ± 1,79*	19,37 ± 1,35*	16,67 ± 1,36*
0,5 Гр + ИС	12,01 ± 1,08	2,99 ± 0,16	3,97 ± 0,37	36,17 ± 1,64	24,44 ± 0,93*	17,96 ± 0,79*

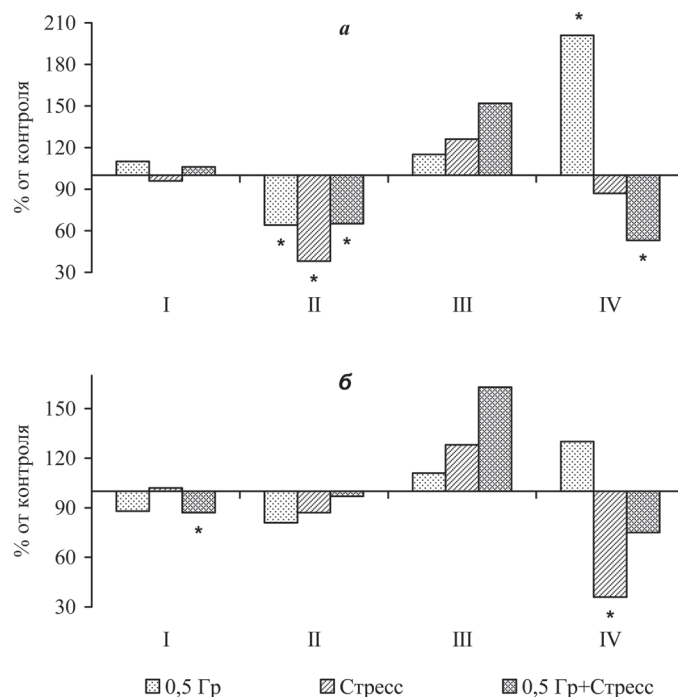
Выраженные диспропорции в процессе сперматогенеза при облучении, иммобилизационном стрессе и их совместном действии наблюдаются и в более отдаленном периоде (на 30-е сутки после воздействий и на 37-е сутки после облучения). Так, на 37-е сутки после действия ионизирующей радиации происходит достоверное падение числа сперматоцитов первого порядка (-34,7 %), сперматоцитов в S-фазе (-25,1 %), круглых сперматид (-18,1 %) и увеличение количества удлиненных сперматид (до 168,5 %) по сравнению с контролем. На 30-е сутки после иммобилизационного стресса и комбинированного действия облучения и иммобилизационного стресса выявляется существенный дисбаланс количества различных типов сперматид.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что под действием указанных факторов, особенно при их комбинированном воздействии, происходит нарушение процесса сперматогенеза, так как на его отдельных этапах происходит как замедление, так и ускорение скорости дифференцировки сперматогенных клеток различных типов. Наиболее значимое нарушение процесса сперматогенеза в отдаленном периоде обусловлено влиянием ионизирующего излучения в дозе 0,5 Гр.

Анализ количества и качества сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса в различные сроки после облучения, иммобилизационного стресса и их комбинированного воздействия, показал следующее. Количество эпидидимальных сперматозоидов на 8-е сутки после облучения изменяется незначительно, а к 37-м суткам оно достоверно снижается до 87,5 % (см. рисунок). Иммобилизационный стресс или облучение с последующим иммобилизационным стрессом в указанные сроки после воздействия не оказывает значительного влияния на количество сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса, за исключением падения их числа на 30-е сутки при комбинированном воздействии облучения и стресса (-13,3 %).

В большей степени негативное влияние облучения и иммобилизационного стресса (изолированно и совместно) проявляется на свойствах эпидидимальных сперматозоидов. Их жизнеспособность достоверно падает в начальном периоде при всех видах воздействия. Однако наиболее существенным это снижение является при иммобилизационном стрессе, когда количество жизнеспособных клеток составляет всего 38,4 % от контрольных значений. Жизнеспособность клеток к 30-м суткам после воздействий (37-е сутки после облучения) постепенно повышается, однако она не достигает уровня контроля.

Установлена устойчивая тенденция к повышению индекса DFI (индекс фрагментации ДНК, который отражает количество одиночных и двойных разрывов в молекуле ДНК) в сперматозоидах при всех видах воздействия, но более значимая при комбинированном действии. Вероятно, разрывы ДНК в сперматозоидах обусловлены изменением структуры хроматина в ходе сперматогенеза и в процессе программированной гибели половых клеток, которые активизируются как при облучении, так и при иммобилизационном стрессе изолированно и совместно.



Изменение количественных и качественных показателей эпидидимальных сперматозоидов и уровня тестостерона в сыворотке крови крыс-самцов после облучения в дозе 0,5 Гр (*а* – 8-е сутки, *б* – 37-е сутки), а также после иммобилизационного стресса и их комбинированного воздействия (*а* – 1-е сутки, *б* – 30-е сутки). I – количество сперматозоидов; II – жизнеспособность сперматозоидов; III – индекс фрагментации DFI (фрагментация ДНК в сперматозоидах); IV – содержание тестостерона в сыворотке крови. * – $p < 0,05$

В сыворотке крови облученных животных (8-е сутки после воздействия) выявляется значительное (достоверное) повышение содержания тестостерона (более чем в 2 раза по сравнению с контролем), в то время как действие стресса и облучения с иммобилизационным стрессом на 1-е сутки вызывало падение уровня этого гормона на 13,1 и 46,6 % соответственно. Нарушение гормональной регуляции репродуктивной системы отмечается и в отдаленном периоде, так как наблюдается повышенный уровень тестостерона при облучении и его падение при иммобилизационном стрессе и комбинированном воздействии. Уровень этого гормона в сыворотке крови зависит от количества гормонпродуцирующих клеток Лейдига, которое под влиянием исследуемых внешних факторов различной природы изменяется [5].

Оценивая результаты исследований ряда авторов о влиянии иммобилизационного стресса на репродуктивную систему крыс-самцов, необходимо отметить их неоднозначность. О резком и выраженном нарушении сперматогенеза при однократном 6-часовом иммобилизационном стрессе свидетельствуют данные работ [4, 5]. Даже кратковременный стресс (30 мин дважды в неделю в течение сперматогенного цикла) влиял на развитие дегенеративных процессов в семенниках, на апоптоз в семенных канальцах, рост количества aberrantных делений половых клеток сперматогенного эпителия, увеличение содержания сперматозоидов на стадии некроза по сравнению с контролем и на увеличение количества гамет с фрагментацией ДНК [12]. В то же время иммобилизационный стресс в течение 2 ч в сутки на протяжении месяца не оказывал влияния на семенники животных [6].

Определенное отличие полученных нами данных от приведенных выше, по-видимому, обусловлено особенностями модели эксперимента, в том числе способом обездвиживания животных и его продолжительностью. Несомненно, состояние репродуктивной системы самцов в значительной мере зависит от длительности и силы воздействия иммобилизационного стресса [13]. В то же время следует учитывать, что при однократном или длительном действии стрессора, особенно если он не носит чрезмерного характера, в семенниках и его придатках могут развиваться процес-

сы адаптации, позволяющие снизить повреждения в нем. Можно также предположить, что модель обездвиживания животных в фиксаторах носит менее травматичный характер по сравнению с иммобилизационным стрессом, создаваемым путем фиксации крыс-самцов в положении на спине [4, 5].

Заключение. Таким образом, указанные стресс-факторы после их воздействия как в отдельности, так и совместно вызывают значительную диспропорцию количественного состава сперматогенных клеток в ткани семенника, выраженное падение их жизнеспособности и повышение фрагментации ДНК в сперматозоидах, выделенных из эпидидимиса, что может привести к снижению фертильности животных. Степень выявленных нарушений при комбинированном воздействии облучения и иммобилизационного стресса на показатели репродуктивной системы крыс-самцов в большинстве случаев существенно выше, чем при изолированном воздействии каждого из них, а обнаруженные изменения носят, как правило, достоверный характер. Установлено также, что восстановления репродуктивной системы крыс-самцов после облучения (доза 0,5 Гр), иммобилизационного стресса (3 ч ежедневно на протяжении 7 сут) и их комбинированного воздействия в течение месяца не происходит.

Литература

1. Кондратенко В. Г. // Успехи соврем. биол. 1977. Т. 83, № 2. С. 305–319.
2. Верецако Г. Г., Ходосовская А. М., Конопля Е. Ф. // Успехи соврем. биол. 1998. Т. 118, № 5. С. 630–644.
3. Sailer B. L., Jost L. K., Erickson K. R. et al. // Environ. and Mol. Mutagenes. 1995. Vol. 25, N 1. P. 25–30.
4. Королев Ю. Н., Курило Л. Ф., Гениатулина М. С., Никулина Л. А. // Андрол. и генит. хирургия. 2012. № 4. С. 25–28.
5. Потемина Т. Е. // Бюл. эксперим. биол. 2008. Т. 145, № 6. С. 645–647.
6. Murthy N. V., Wray S. R., Melville G. N. et al. // Int. J. Gynaecol. Obstet 1988. Vol. 26, N 2. P. 297–299.
7. Rai J., Pandey S. N., Srivastava R. K. // J. Anat. Soc. India. 2003. Vol. 52, N 1. P. 55–57.
8. Suresh R., Aravindan G. R., Moudgal N. R. // J. Biosci. 1992. Vol. 17, N 4. P. 413–419.
9. Евдокимов В. В., Коденцова В. М., Вржесинская О. А. и др. // Бюл. эксперим. биол. 1997. Т. 123, № 5. С. 524–527.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press. Geneva (Switzerland), 2010. P. 26–28.
11. Evenson D. P., Larson K. L., Jost L. K. // J. Andrology. 2002. Vol. 23, N 1. P. 25–43.
12. Макутина В. А., Балезин С. Л., Слышкина Т. В. и др. // Медицина труда и промышленная экология. 2014. № 6. С. 30–34.
13. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. М., 1988. – 256 с.

G. G. VERESCHAKO, N. V. CHUESHOVA, G. A. GOROKH, A. D. NAUMOV

COMBINED ACTION OF RADIATION AND IMMOBILIZATION STRESS ON REPRODUCTIVE SYSTEM MALE RATS STATION

Summary

It was studied the effect of irradiation (0.5 Gy), immobilization stress (3 hours/day for 7 days), and their combined effect on the reproductive system of male rats. The action of these factors, individually or together caused a significant imbalance quantitative composition of the spermatogenic cells in the testis tissue, marked decrease the viability of epididymal spermatozoa, and increased DNA fragmentation in them, which may result in reduced fertility of animals. Under these influences reproductive disorders save for a long time. In some cases, the effects of the combined action of irradiation and immobilization stress is significantly higher than the isolated action of each of them.