

УДК 616–092.12: 612.6

Е. А. ПОПЛАВСКАЯ, Р. Е. ЛИС

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ (*E. COLI* И *S. MARCESCENS*)
ВВЕДЕННЫХ САМЦАМ КРЫС, НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ
В ЦИТОПЛАЗМЕ СПЕРМАТОЦИТОВ ПЕРВОГО ПОРЯДКА**

Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: len.poplavska@mail.ru

(Поступила в редакцию 10.06.2013)

Введение. Актуальной проблемой для Беларуси является демографическая ситуация. Снижение прироста населения обусловлено как социальными, так и биологическими аспектами. Оказать императивное влияние на социальный аспект данной проблемы не представляется возможным, так как социальные процессы слишком инерционны, поэтому внимание исследователей концентрируется, прежде всего, на биологических аспектах, в качестве которых выступают мужское и женское бесплодие, а также невынашивание беременности [4, 8, 12, 13].

Невынашивание беременности может происходить как в результате преждевременной родовой деятельности, так и в результате гибели зародыша. Среди причин гибели зародыша инфекции рассматриваются как ведущий фактор, возбудителями которых выступают как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы [3]. Кроме жизнеспособных микробов, эмбриотоксическое действие оказывают и их эндотоксины, представляющие собой липополисахариды (ЛПС). Известно, что бактериальные липополисахариды при воздействии на организм матери во время беременности вызывают нарушения процессов антенатального развития и, как следствие, приводят к нарушениям процессов постнатального развития потомства [1, 6]. При этом наблюдается прямой контакт эндотоксинов с организмом матери. Все вышеприведенные факты ставят во главу угла в этиологии прерывания беременности или нарушений процессов антенатального развития только взаимоотношение организма матери и зародыша [2]. Однако, согласно нашим исследованиям, бактериальные липополисахариды грамотрицательных микроорганизмов (*E. coli* и *S. marcescens*), введенные самцам крыс за 45–55 сут до спаривания, приводят к резкому увеличению доимплантационной гибели их потомства [9, 10]. В данном случае прямое действие липополисахаридов на зародыш исключается, так как единственным связующим звеном между организмом самки и самца является сперматозоид. Исходя из этого, можно предположить, что причиной репродуктивных потерь является нарушение сперматогенеза под воздействием липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов. Сперматогенез – сложный многостадийный процесс роста, созревания и формирования сперматозоидов из незрелых половых клеток. Нормальное протекание сперматогенеза требует скоординированного влияния многочисленных факторов – генетических, клеточных, гормональных и др. Подобная сложность делает сперматогенез «легкой мишенью» для всякого рода негативных воздействий, в том числе и липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов [11]. На наш взгляд, наиболее подвержены воздействиям различных факторов клетки сперматогенного эпителия в профазе первого мейотического деления из-за большой продолжительности фазы и уникальности процессов, происходящих при этом: конъюгации и кроссинговера гомологичных хромосом.

В связи с вышеизложенным представляет несомненный интерес исследование влияния бактериальных ЛПС грамотрицательных микроорганизмов на сперматогенез и, в частности, на клетки сперматогенного эпителия семенных канальцев семенников.

Цель работы – изучить влияние бактериальных липополисахаридов грамотрицательных бактерий (*E. coli* и *S. marcescens*), введенных самцам крыс, на активность ключевых ферментов пентозофосфатного шунта, анаэробного гликолиза, а также НАДН-дегидрогеназы и НАДФН-дегидрогеназы в цитоплазме сперматоцитов первого порядка семенных канальцев на 1,3,6-е сутки после введения.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись половозрелые самцы беспородных белых крыс. В качестве агента воздействия использовались бактериальные липополисахариды *Escherichia coli* серотип 0111: B4 и *Serratia marcescens*, производство фирмы Sigma, США.

В эксперименте было использовано 60 самцов беспородных белых крыс. Масса самцов составляла 200–250 г. Все животные содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением требований, изложенных в Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными.

Из самцов были сформированы шесть подопытных, три контрольные и одна интактная группы. Самцам подопытных групп вводился ЛПС *E. coli* или *S. marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы внутривенно, однократно, самцам контрольных групп – физиологический раствор в эквивалентном количестве. Самцы интактной группы не подвергались никаким воздействиям. На 1, 3 и 6-й дни после воздействия ЛПС самцов подопытных, контрольных и интактной группы усыпляли парами эфира с последующей декапитацией. Животных вскрывали и выделяли семенники. Сразу после взятия, половину семенника замораживали в жидком азоте. Из замороженного кусочка семенника готовили криостатные срезы толщиной 10 мкм в микротоме-криостате Microm HM 525 при температуре – 25 °С. На криостатных срезах проводили гистохимические реакции по выявлению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – маркера анаэробного гликолиза; НАДН₂-дегидрогеназы (НАДН₂ДГ) – показателя активности митохондриальных процессов; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) – маркера пентозофосфатного шунта и НАДФН₂-дегидрогеназы (НАДФН₂ДГ) – показателя обеспеченности синтетических процессов [5, 7]. Все гистохимические исследования сопровождались безубстратными контролями.

Уровень активности ферментов учитывался с помощью компьютерной системы анализа изображений BIOSCAN-NT по коэффициенту пропускания окрашенного среза в единицах оптической плотности. Оценку достоверности изменения численных значений проводили с помощью непараметрической статистики с применением компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между показателями считали статистически достоверными, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Уровень активности исследуемых ферментов изменяется неоднозначно в зависимости от срока введения.

У самцов, получавших ЛПС *E. coli*, на 1-е сутки после введения происходит увеличение уровня активности практически всех исследуемых ферментов, за исключением Г6ФДГ: уровень активности ЛДГ повышен на 9,33 %; уровень активности НАДН₂ДГ – на 9,35 % и уровень НАДФН₂ДГ – на 49,27 % (табл. 1). При этом достоверно от интактного показателя отличается уровень НАДФН₂ДГ. У самцов, получавших ЛПС *S. marcescens*, на 1-е сутки после введения также происходит увеличение уровня активности практически всех исследуемых ферментов, за исключением НАДН₂ДГ: уровень активности Г6ФДГ повышен на 8,06 %, уровень активности ЛДГ – на 9,33 % и уровень НАДФН₂ДГ – на 26,81 % (табл.1). Однако различия с интактными показателями статистически недостоверны. В контрольной группе наблюдается как повышение уровня активности исследуемых ферментов, так и его понижение: уровни активности Г6ФДГ и НАДН₂ДГ повышены соответственно на 6,45 и 16,54 %, а уровни активности ЛДГ и НАДФН₂ДГ понижены соответственно на 2,00 и 11,60 % (табл. 1). Различия с интактными показателями статистически недостоверны.

У самцов, получавших ЛПС *E. coli*, на 3-е сутки после введения происходит увеличение уровня активности всех исследуемых ферментов: уровень активности Г6ФДГ повышен на 6,45 %, уровень активности ЛДГ – на 29,00 %, уровень активности НАДН₂ДГ – на 58,63 % и уровень НАДФН₂ДГ – на 47,48 % (табл. 2). При этом достоверно от интактных показателей отличаются

Т а б л и ц а 1. Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматоцитов первого порядка самцов подопытных, контрольных и интактных групп на 1-е сутки после воздействия

Воздействие	Фермент	Медиана	% к интактным показателям	Верхний квартиль 25 %	Нижний квартиль 75 %
	Г6ФДГ				
<i>E. coli</i>		63,00	101,61	51,00	69,50
<i>S. marcescens</i>		67,00	108,06	55,00	70,00
Контроль		66,00	106,45	60,00	71,00
Интактные		62,00		46,00	71,00
	ЛДГ				
<i>E. coli</i>		164,00	109,33	159,00	166,00
<i>S. marcescens</i>		164,00	109,33	154,00	166,00
Контроль		147,00	98,00	139,00	157,00
Интактные		150,00		142,00	166,00
	НАДН₂ДГ				
<i>E. coli</i>		152,00	109,35	140,00	171,00
<i>S. marcescens</i>		138,50	99,60	123,00	186,00
Контроль		162,00	116,54	150,00	168,00
Интактные		139,00		131,00	162,00
	НАДФН₂ДГ				
<i>E. coli</i>		206,00*	149,27	201,00	211,00
<i>S. marcescens</i>		175,50	126,81	153,00	189,00
Контроль		122,00	88,40	112,00	127,00
Интактные		138,00		132,00	139,00

* Статистически достоверные различия с интактными при $p < 0,05$.

Т а б л и ц а 2. Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматоцитов первого порядка самцов подопытных, контрольных и итактных групп на 3-е сутки после воздействия

Воздействие	Фермент	Медиана	% к интактным показателям	Верхний квартиль 25 %	Нижний квартиль 75 %
	Г6ФДГ				
<i>E. coli</i>		66,00	106,45	60,00	70,00
<i>S. marcescens</i>		64,50	104,03	53,00	75,00
Контроль		55,50	89,52	34,0	66,00
Интактные		62,00		46,00	71,00
	ЛДГ				
<i>E. coli</i>		192,00*	128,00	190,00	198,00
<i>S. marcescens</i>		161,00	107,33	123,00	203,00
Контроль		160,00	106,66	131,00	174,00
Интактные		150,00		166,00	150,00
	НАДН₂ДГ				
<i>E. coli</i>		220,50*	158,63	217,00	234,00
<i>S. marcescens</i>		205,00**	147,48	193,00	210,00
Контроль		172,50	124,10	141,00	183,00
Интактные		139,00		131,00	162,00
	НАДФН₂ДГ				
<i>E. coli</i>		145,50	105,43	138,00	181,00
<i>S. marcescens</i>		116,00	84,05	106,00	130,00
Контроль		154,50	111,95	105,00	212,00
Интактные		138,00		132,00	139,00

* Статистически достоверные различия с интактными показателями при $p < 0,05$.

** Статистически достоверные различия с контрольными показателями при $p < 0,05$.

То же для табл. 3.

уровни ЛДГ и НАДН₂ДГ. У самцов, получавших ЛПС *S. marcescens*, на 3-е сутки после введения наблюдается увеличение уровня активности у трех ферментов: Г-6-ФДГ – на 4,03 %; ЛДГ – на 7,33 %; НАДН₂ДГ – на 47,48 % (табл. 2) Уменьшение уровня активности происходит только у НАДФН₂ДГ – на 15,95 % (табл. 2). Статистически достоверно по сравнению с интактными показателями повышен уровень активности НАДН₂ДГ. В контрольной группе наблюдается как повышение уровня активности исследуемых ферментов, так и его понижение: уровни активности ЛДГ, НАДН₂ДГ и НАДФН₂ДГ повышены соответственно на 6,66, 24,1 и 11,95 %, а уровень активности Г6ФДГ снижен на 10,48 % (табл. 2). Различия с интактными показателями статистически недостоверны, как и на 1-е сутки после воздействия.

У самцов, получавших ЛПС *E. coli*, на 6-е сутки после введения наблюдается как повышение уровня активности исследуемых ферментов, так и его понижение: уровни активности Г6ФДГ и ЛДГ несколько повышены соответственно на 3,23 и 16,00 %, а уровни активности НАДН₂ДГ и НАДФН₂ДГ понижены на 11,52 и 13,05 % соответственно (табл. 3). Различия в данном случае с интактными показателями статистически недостоверны. У самцов, получавших ЛПС *S. marcescens*, на 6-е сутки после введения наблюдается увеличение уровня активности у трех ферментов: Г6ФДГ – на 36,29 %, ЛДГ – на 18,66 %, НАДН₂ДГ – на 23,38 % (табл. 3). Уменьшение уровня активности происходит только у НАДФН₂ДГ – на 16,67 % (табл. 3). Статистически достоверно по сравнению с интактными показателями повышен уровень активности Г6ФДГ. В контрольной группе наблюдается незначительное статистически недостоверное повышение уровня активности всех исследуемых ферментов: Г6ФДГ – на 10,48 %, ЛДГ – на 4,33, НАДН₂ДГ – на 1,07 и НАДФН₂ДГ – на 8,33 %.

Согласно полученным данным, ЛПС грамотрицательных бактерий вызывает у самцов белых крыс повышение уровня активности всех исследуемых ферментов. Однако на каждый срок исследования регистрируется изменение активности одного или нескольких исследуемых ферментов при введении разных липополисахаридов: на 1-е сутки после введения ЛПС *E. coli* статистически достоверно повышен уровень активности НАДФН₂-ДГ; на 3-е сутки после введения ЛПС *E. coli* статистически достоверно повышены уровни активности ЛДГ и НАДН₂ДГ; при введении ЛПС *S. marcescens* на этот же срок статистически достоверно повышен уровень активности НАДН₂ДГ; на 6-е сутки после введения ЛПС *S. marcescens* статистически достоверно повышен

Т а б л и ц а 3. Уровень активности (в единицах оптической плотности $\times 1000$) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматоцитов первого порядка самцов подопытных, контрольных и интактных групп на 6-е сутки после воздействия

Воздействие	Фермент	Медиана	% к интактным показателям	Верхний квартиль 25 %	Нижний квартиль 75%
	Г6ФДГ				
<i>E. coli</i>		64,00	103,23	64,00	70,00
<i>S. marcescens</i>		84,50**	136,29	78,00	96,00
Контроль		68,50	110,48	57,00	76,00
Интактные		62,00		46,00	71,00
	ЛДГ				
<i>E. coli</i>		174,00	116,00	168,00	177,00
<i>S. marcescens</i>		178,00	118,66	154,00	204,00
Контроль		156,50	104,33	150,00	169,00
Интактные		150,00		142,00	166,00
	НАДН ₂ ДГ				
<i>E. coli</i>		123,00	88,48	115,00	200,00
<i>S. marcescens</i>		171,50	123,38	152,00	209,00
Контроль		140,50	101,07	110,00	172,00
Интактные		139,00		131,00	162,00
	НАДФН ₂ ДГ				
<i>E. coli</i>		120,00	86,95	77,00	142,00
<i>S. marcescens</i>		115,00	83,33	114,00	151,00
Контроль		149,50	108,33	145,00	169,00
Интактные		138,00		132,00	139,00

уровень активности Г6ФДГ. Изменение уровня активности исследуемых ферментов является следствием изменения окислительного статуса в организме крыс и, в частности в семенниках, в ответ на введение ЛПС грамотрицательных бактерий. Увеличение активности НАДФН₂ДГ свидетельствует об увеличении выработки НАДФН₂, который используется для восстановления активности антиоксидантов (глутатиона, аскорбиновой кислоты и витамина Е). Увеличение выработки НАДФН₂ подтверждается также увеличением уровня активности Г6ФДГ, ключевого фермента пентозофосфатного шунта, которое регистрируется на 6-е сутки после введения липополисахаридов, когда наблюдается некоторое снижение уровня активности НАДФН₂ДГ. Увеличение активности НАДН₂ДГ – первого фермента электрон-транспортной цепи – свидетельствует об усилении окисления в дыхательной цепи митохондрий НАД-зависимых субстратов с получением АТФ. Увеличение количества НАДН₂ДГ происходит в результате активации гликолиза, что подтверждается увеличением активности ЛДГ на этот же срок.

Заключение. Введение ЛПС грамотрицательных бактерий *E. coli* и *S. marcescens* самцам белых крыс приводит к увеличению активности Г6ФДГ, ЛДГ, НАДН₂ДГ и НАДФН₂ДГ в цитоплазме сперматоцитов первого порядка в течение первой недели после введения. Изменение активности вышеперечисленных ферментов связано напрямую или косвенно с процессами окислительного стресса, который вызывается введением липополисахаридов. При окислительном стрессе выделяются активные формы кислорода (пероксид водорода, синглетный кислород, супероксид анион радикал, гидроксильный радикал). В частности, гидроксильный радикал (ОН[•]) обладает наибольшей цитотоксичностью среди активных форм кислорода. Главными видами повреждений биомолекул являются: во-первых, отрыв атома водорода (повреждается лецитин – компонент биологических мембран, а также сахара в составе нуклеозидов ДНК); во-вторых, присоединение к молекулам по двойным связям (взаимодействие с пуринами и пиримидинами ДНК и РНК).

Прямое повреждение ДНК при этом характеризуется разрывом цепи, окислением оснований, их модификации, образованием гидропероксидов ДНК, повреждением хромосом. Следствием повреждения ДНК сперматозоидов является появление доминантных леталей у зародышей при оплодотворении яйцеклетки (ооцита второго порядка), которое и приводит к увеличению их предимплантационной гибели.

Литература

1. Бандажевский Ю. И. Иммунная регуляция онтогенеза. Гомель, 1994.
2. Беломестнов С. Р., Мальгина Г. Б., Токарь В. И. и др. Качество гамет и особенности гормонального статуса мужчин из супружеских пар с неблагоприятным течением беременности // Материалы 4 Российского форума «Мать и Дитя». М., 2004. С. 602–603.
3. Гуртовой Б. Л., Кулаков В. И., Воропаева С. Д. Применение антибиотиков в акушерстве и гинекологии. 2-е изд., доп. и испр. М., 2004.
4. Доброхотова Ю. Э., Савченко Т. Н. Неразвивающаяся беременность: учебно-методическое пособие / Под ред. О. В. Макарова. М., 2002. С. 5–10.
5. Ковальский Г. Б., Журавлева Т. В., Прочуханова Р. А. Количественная гистохимия дегидрогеназ // Введение в количественную гистохимию ферментов / Под ред. Т. В. Журавлевой, Р. А. Прочухановой. М., 1978.
6. Лис Р. Е., Бандажевский Ю. И. // Изв. АН БССР. Сер. биол. наук. 1986. № 4. С. 76–79.
7. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., 1982.
8. Макацария А. Д., Киселева-Романова Е. А., Кролл Ж. Б., Бухаева Я. Ш. // Материалы науч. форума «Новые технологии в акушерстве и гинекологии». М., 1999. С. 239–247.
9. Поплавская Е. А., Лис Р. Е. // Журнал ГрГМУ. 2007. № 1. С. 165–166.
10. Поплавская Е. А., Лис Р. Е. // Новости мед.-биол. наук. 2012. Т. 6, № 4. С. 140–144.
11. Черных В. // Журн. 9 месяцев. 2005. № 9. С. 1–3.
12. Picciano M. F. // Am. J. Clin. Nutr. 2000. Vol. 71, № 4. P. 857–858.
13. Powers R. W., Evans R. W., Majors A. K. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. 1998. Vol. 179. P. 1605–1611.

E. A. POPLAWSKAYA, R. E. LIS

THE INFLUENCE OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA (*E. COLI* AND *S. MARCESCENS*) OF ESTABLISHED MALE RATS ON ENZYME ACTIVITY IN THE CYTOPLASM OF SPERMATOCYTES OF THE 1ST ORDER

Summary

The introduction of lipopolysaccharide of gram-negative bacteria, *E. coli* and *S. marcescens*, male albino rats leads to increased activity of enzymes, G6PDH, LDH, NADH and NADPH, in the cytoplasm of spermatocytes of the first order during the first week after administration.