

© ПОПЛАВСКАЯ Е.А., ЛИС Р.Е., 2013

## **ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Escherichia coli*, ВВЕДЕННОГО САМЦАМ КРЫС, НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЦИТОПЛАЗМЕ СПЕРМАТОЦИТОВ ПЕРВОГО ПОРЯДКА**

ПОПЛАВСКАЯ Е.А., ЛИС Р.Е.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

---

### **Резюме.**

В работе изложены результаты экспериментальных исследований, касающихся влияния бактериального липополисахарида *E.coli*, введенного самцам крыс, на активность Г6ФДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ в цитоплазме сперматоцитов 1-го порядка семенных канальцев на 10-60 сутки после введения. Показано, что введение ЛПС *E.coli* самцам белых крыс приводит к снижению уровня активности ключевых ферментов пентозофосфатного шунта, анаэробного гликолиза, а также НАДН-дегидрогеназы и НАДФН-дегидрогеназы в цитоплазме сперматоцитов 1-го порядка семенных канальцев в течение длительного периода после введения.

Ключевые слова: бактериальный липополисахарид, семенник, ферменты.

### **Abstract.**

The paper deals with the results of experimental studies concerning the influence of bacterial lipopolysaccharide *E.coli*, administered to male rats, on the activity of G6PDH, LDH, NADH-dehydrogenase and NADPH-dehydrogenase in the cytoplasm of primary spermatocytes of the seminiferous tubules on the 10th-60th days after administration. The administration of LPS *E.coli* to white male rats was shown to lead to decreased level of the activity of key enzymes of the pentose phosphate shunt, anaerobic glycolysis, and NADH-dehydrogenase and NADPH-dehydrogenase in the cytoplasm of primary spermatocytes of the seminiferous tubules for a long period after administration.

Key words: bacterial lipopolysaccharide, testis, enzymes.

---

В настоящее время во многих странах мира наблюдается неблагоприятная демографическая ситуация. Эта проблема является актуальной и для Беларуси. Снижение прироста населения обусловлено как социальными, так и биологическими аспектами. В качестве социальных аспектов выступают: во-первых, вступление в фазу генерации поколения второй половины 80-х, первой половины 90-х годов прошлого века, когда рождаемость была снижена, во-вторых, менталитет населения в отношении численности семьи. Биологическими аспектами являются возрастание мужского и женского бесплодия, а также возрастание числа невынашиваний беременности. Значительно повлиять на социальный аспект данной проблемы не представляется возможным,

поэтому внимание исследователей концентрируется, прежде всего, на вопросах снижения процента невынашивания беременности. По разным данным, в 20-40% случаев причина невынашиваний беременности остается до конца неясной [4, 8, 14].

Невынашивание беременности может происходить как в результате преждевременной родовой деятельности, так и в результате гибели зародыша. Среди причин гибели зародыша инфекции, возбудителями которых выступают как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы, рассматриваются как ведущий фактор [3]. Кроме жизнеспособных грамотрицательных микробов, эмбриотоксическое действие оказывают и их эндотоксины, представляющие собой

липополисахариды (ЛПС). Известно, что бактериальные липополисахариды грамотрицательных микроорганизмов 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 вышеприведённые 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, введенные самцам крыс за 45-55 суток до спаривания, приводят к резкому увеличению доимплантационной гибели их потомства [10, 11]. 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 одной из причин 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 других. Подобная сложность делает сперматогенез «легкой мишенью» для всякого рода негативных воздействий, в том числе и воздействия липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов [12]. На наш взгляд, клетки сперматогенного эпителия наиболее подвержены воздействиям различных факторов 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. Поэтому в

нашем исследовании была поставлена цель – изучить влияние бактериального липополисахарида *Escherichia coli* (*E.coli*), введенного самцам крыс, на активность ключевых ферментов пентозофосфатного шунта, анаэробного гликолиза, а также НАДН<sub>2</sub>-дегидрогеназы и НАДФН<sub>2</sub>-дегидрогеназы в цитоплазме сперматоцитов 1-го порядка семенных канальцев на 10 - 60 сутки после введения.

## Методы

Объектом исследования являлись половозрелые самцы беспородных белых крыс. В качестве агента воздействия использовали бактериальный липополисахарид *Escherichia coli* серотип 0111:B4, производство фирмы «Sigma», США.

В эксперименте было использовано 78 самцов беспородных белых крыс. Масса самцов составляла 200 - 250 грамм. 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, шесть контрольных и одна интактная группы. Самцам подопытных групп вводился ЛПС *E. coli* в дозе 50 мкг/кг массы внутрибрюшинно, однократно. Самцам контрольных групп вводили физиологический раствор в эквивалентном количестве. Самцы интактной группы не подвергались никаким воздействиям. На 10-й, 20-й, 30-й, 40-й, 50-й и 60-й дни после воздействия ЛПС самцов подопытных, контрольных и интактной групп 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 минус 25°C. На криостатных срезах проводили гистохимические реакции по выявлению активности: лактатдегидрогеназы (ЛДГ) - маркера анаэробного гликолиза; НАДН<sub>2</sub>-дегидрогеназы (НАДН<sub>2</sub>ДГ) - показателя активности митохондриальных процессов; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГбФДГ) - маркера пентозофосфатного шунта и НАДФН<sub>2</sub>-дегидрогеназы (НАДФН<sub>2</sub>ДГ)

- показателя обеспеченности синтетических процессов [5, 7]. Все гистохимические исследования сопровождались безсубстратными контролями.

Уровень активности ферментов учитывали 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 осуществляли 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

У самцов, получавших ЛПС *E. coli*, происходило значительное снижение уровня активности исследуемых ферментов в цитоплазме сперматоцитов 1-го порядка на все сроки после введения.

На 10-е сутки после введения происходило снижение уровня активности всех исследуемых ферментов: активность Г6ФДГ снижена на 53,04%; ЛДГ - на 37,89%; НАДН<sub>2</sub>ДГ - на

40,28% и НАДФН<sub>2</sub>ДГ - на 32,24%. Различия статистически достоверны по сравнению с интактными и контрольными показателями (рис. 1). У контрольных животных активность Г6ФДГ была снижена на 46,20%, ЛДГ - на 25,76%, НАДН<sub>2</sub>ДГ - на 34,89%, НАДФН<sub>2</sub>ДГ - на 26,80% (рис.1).

На 20-е сутки после введения происходило снижение уровня активности Г6ФДГ на 71,93%, ЛДГ - на 19,66%, НАДН<sub>2</sub>ДГ - на 28,38%, НАДФН<sub>2</sub>ДГ - на 14,31%. Различия были статистически достоверными по сравнению с интактными показателями (рис. 2). Наблюдались статистически достоверные различия и по сравнению с контрольными показателями: были снижены Г6ФДГ - на 65,44% и НАДН<sub>2</sub>ДГ - на 22,71% (рис. 2).

На 30-е сутки после введения происходило снижение уровня активности следующих ферментов: Г6ФДГ - на 35,95%, НАДН<sub>2</sub>ДГ - на 33,68%, НАДФН<sub>2</sub>ДГ - на 22,48%. При этом различия были статистически достоверными по сравнению с интактными показателями (рис. 3). Происходило статистически достоверное снижение уровня активности по сравнению с контрольными показателями перечисленных ниже ферментов: НАДН<sub>2</sub>ДГ - на 39,73%, НАДФН<sub>2</sub>ДГ - на 17,87%. Однако статистически достоверно повышался уровень активности ЛДГ по сравнению с контрольными показателями и составлял 15,21% (рис. 3).

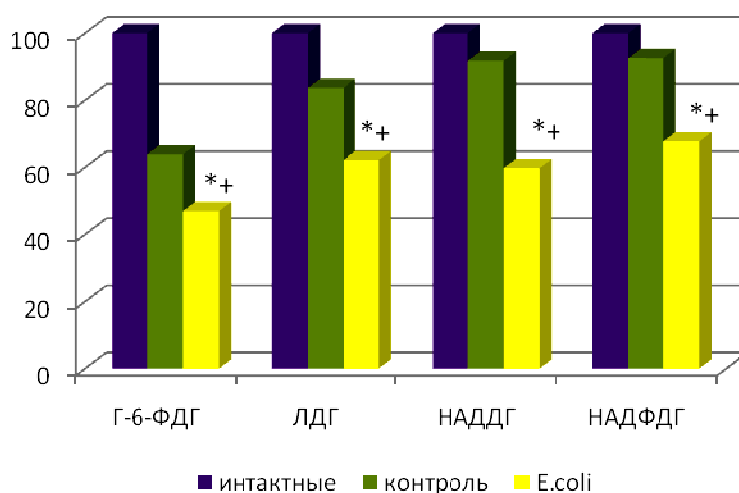


Рисунок 1 – Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматоцитов I порядка самцов интактных, контрольных и подопытных групп на 10-е сутки после воздействия. Примечание:  $P < 0,05^*$  - статистически достоверные различия с интактными показателями;  $p < 0,05^{+}$  - статистически достоверные различия с контрольными показателями.

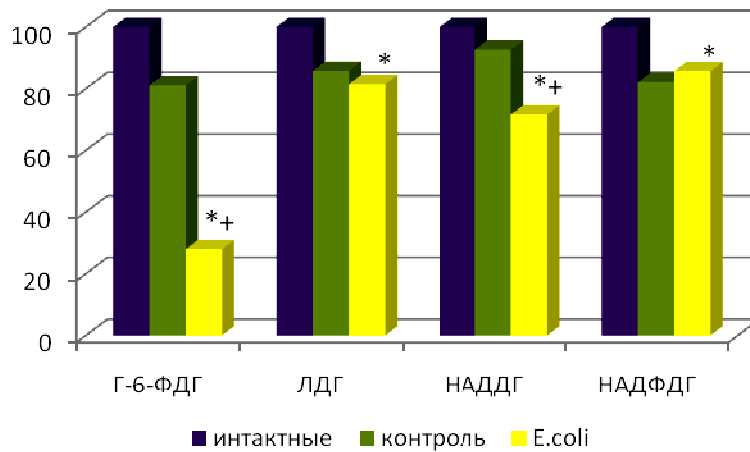


Рисунок 2 – Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматозоидов I порядка самцов интактных, контрольных и подопытных групп на 20-е сутки после воздействия. Примечание: P<0,05\*- статистически достоверные различия с интактными показателями; p<0,05+- статистически достоверные различия с контрольными показателями.

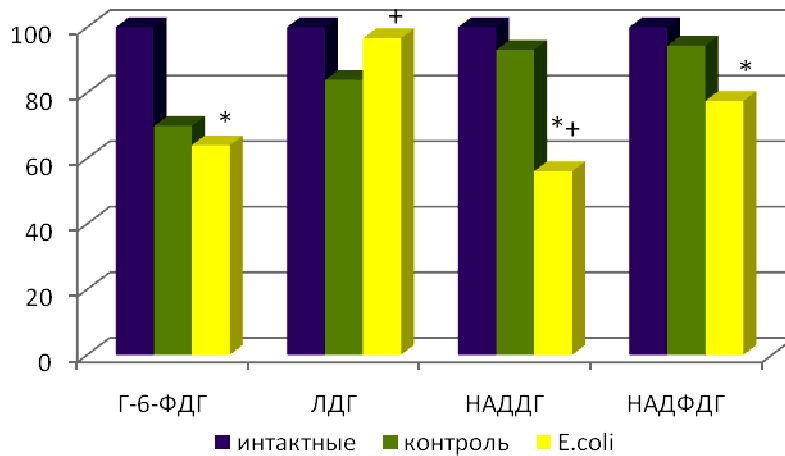


Рисунок 3 – Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматозоидов I порядка самцов интактных, контрольных и подопытных групп на 30-е сутки после воздействия. Примечание: P<0,05\*- статистически достоверные различия с интактными показателями; p<0,05+- статистически достоверные различия с контрольными показателями.

На 40-е сутки после введения происходило снижение уровня активности Г6ФДГ – на 58,67% и ЛДГ – на 8,32%. Различия были статистически достоверными с интактными показателями (рис. 4). Статистически достоверно по сравнению с контрольными показателями снижался уровень активности Г6ФДГ и составлял 45,52% (рис. 4).

На 50-е сутки после введения наблюдалось статистически достоверное снижение уровня активности Г6ФДГ - на 27,06% и

НАДН<sub>2</sub>ДГ – на 31,72% по сравнению с интактными показателями (рис. 5). Наблюдались также статистически достоверные различия и с контрольными показателями: были снижены НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ – на 28,07% и 6,17% соответственно (рис. 5).

На 60-е сутки после введения также происходило снижение уровня активности всех исследуемых ферментов, однако статистически достоверные различия наблюдались по сравнению с интактными показателями в измене-

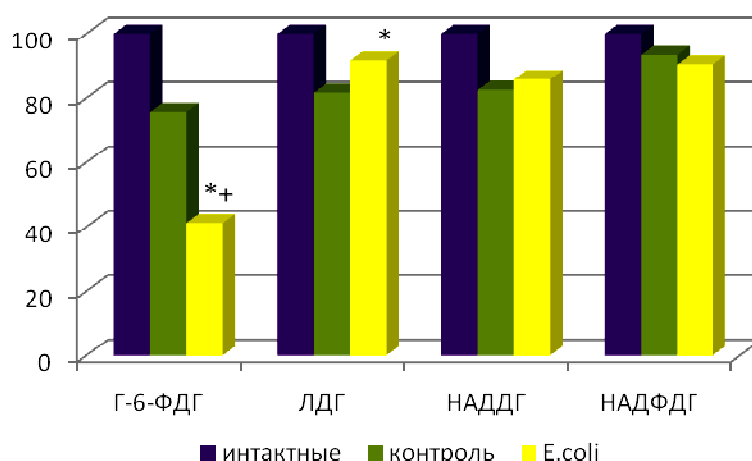


Рисунок 4 – Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматозоидов I порядка самцов интактных, контрольных и подопытных групп на 40-е сутки после воздействия. Примечание: P<0,05\* - статистически достоверные различия с интактными показателями; p<0,05+ - статистически достоверные различия с контрольными показателями.

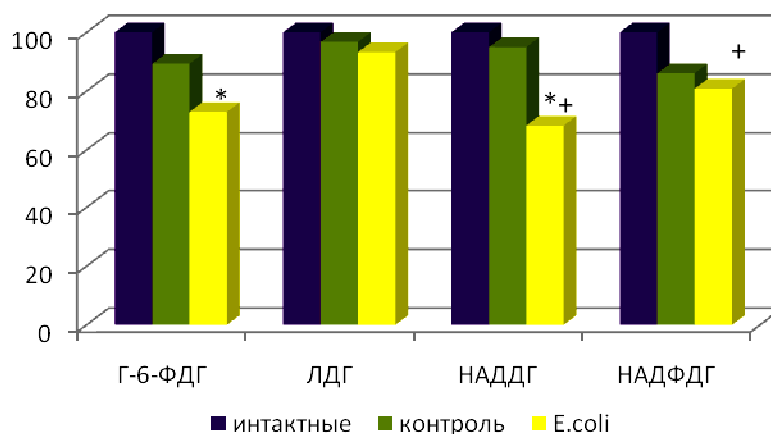


Рисунок 5 – Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматозоидов I порядка самцов интактных, контрольных и подопытных групп на 50-е сутки после воздействия. Примечание: P<0,05\* - статистически достоверные различия с интактными показателями; p<0,05+ - статистически достоверные различия с контрольными показателями.

нии уровня активности ЛДГ (на 18,48%) (рис. 6). Статистически достоверно по сравнению с контрольными показателями снижался уровень активности Г6ФДГ, ЛДГ, НАДФН<sub>2</sub>ДГ и составлял 12,85%, 13,91% и 7,95% соответственно (рис. 6).

### Обсуждение

Согласно полученным данным, введение ЛПС E.coli вызывает у самцов белых крыс снижение уровня активности Г6ФДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ на все исследуемые

сроки после введения. На 10-е сутки после введения происходит достоверное снижение уровня активности всех исследуемых ферментов по сравнению с интактными показателями. Наблюдаются также статистически достоверные различия всех исследуемых ферментов и с контрольными показателями, кроме ЛДГ. Снижение активности ферментов наблюдается и все последующие сроки после введения. На 20-е сутки достоверно по сравнению с интактными снижается уровень активности Г6ФДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ, по сравнению с контрольными - Г6ФДГ и НАДН<sub>2</sub>ДГ. На 30-е

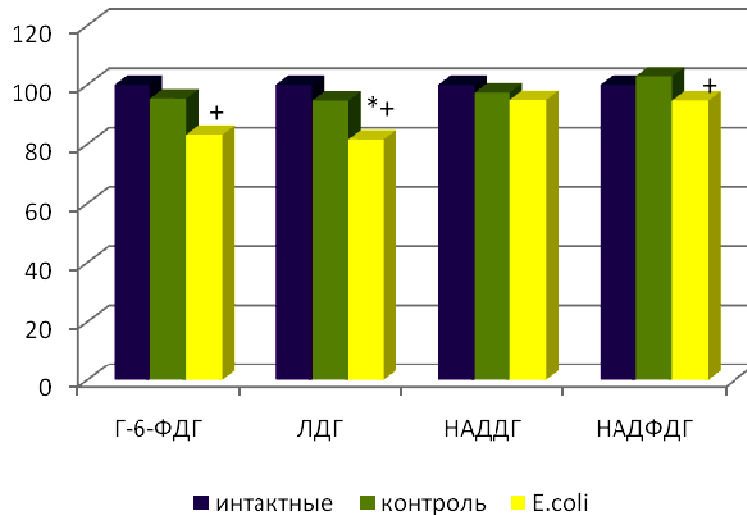


Рисунок 6 – Уровень активности (в единицах оптической плотности x 1000) Г6ФДГ, ЛДГ, НАДДГ и НАДФДГ в цитоплазме сперматоцитов I порядка самцов интактных, контрольных и подопытных групп на 60-е сутки после воздействия. Примечание: P<0,05\*- статистически достоверные различия с интактными показателями; p<0,05+- статистически достоверные различия с контрольными показателями.

сутки снижается уровень активности Г6ФДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ, различия статистически достоверны по сравнению с интактными показателями. По сравнению с контрольными показателями снижается уровень активности НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ. В свою очередь, уровень активности ЛДГ повышается - различия статистически достоверны по сравнению с контрольными показателями. На 40-е сутки после введения происходит снижение уровня активности ферментов Г6ФДГ, различия статистически достоверны и с интактными, и с контрольными показателями. Происходит также снижение уровня активности ЛДГ по сравнению с интактными показателями. Уровень активности НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ не имеет достоверных различий ни с интактными, ни с контрольными показателями. На 50-е сутки после введения наблюдается статистически достоверное снижение уровня активности Г6ФДГ и НАДН<sub>2</sub>ДГ по сравнению с интактными показателями. Достоверно снижены также уровни активности НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ по сравнению с контрольными показателями. Уровень активности ЛДГ практически от интактных и контрольных показателей не отличается. На 60-е сутки после введения ЛПС E.coli также происходит снижение уровня активности всех исследуемых ферментов. Однако статистически достоверные раз-

личия наблюдаются по сравнению с интактными показателями только уровня активности ЛДГ, а по сравнению с контрольными – уровень активности Г6ФДГ, ЛДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ. Изменение уровня активности НАДН<sub>2</sub>ДГ по сравнению с интактными и контрольными показателями статистически не достоверно.

Изменение уровня активности исследуемых ферментов является следствием изменения окислительного статуса в организме крыс и, в частности, в семенниках, в ответ на введение ЛПС [13]. Снижение активности НАДФН<sub>2</sub>ДГ свидетельствует об уменьшении выработки НАДФН<sub>2</sub>, который используется для восстановления активности антиоксидантов (глутатиона, аскорбиновой кислоты и витамина E) [9]. В свою очередь, снижение выработки НАДФН<sub>2</sub> подтверждается также уменьшением уровня активности Г6ФДГ, ключевого фермента пентозофосфатного шунта [5], которое регистрируется практически во все сроки после введения липополисахарида. Известно, что пентозофосфатный шунт является одним из основных поставщиков восстановленной формы НАДФ в организме. Снижение активности НАДН<sub>2</sub>ДГ - первого фермента электрон-транспортной цепи - свидетельствует об ослаблении окисления в дыхательной цепи митохондрий НАД-зависимых субстратов с получением АТФ.

## Заключение

Введение ЛПС *E.coli* самцам белых крыс приводит к снижению уровня активности Г6ФДГ, ЛДГ, НАДН<sub>2</sub>ДГ и НАДФН<sub>2</sub>ДГ в цитоплазме сперматоцитов первого порядка в течение длительного периода после введения. Изменение активности вышеперечисленных ферментов связано напрямую или косвенно с процессами окислительного стресса, который вызывается введением липополисахарида.

## Литература

1. Бандажевский, Ю.И. Иммунная регуляция онтогенеза. – Гомель: Гомел. гос. мед. ун-т, 1994. – 59 с.
2. Качество гамет и особенности гормонального статуса мужчин из супружеских пар с неблагоприятным течением беременности / С. Р. Беломестнов [и др.] // *Мать и Дитя: материалы 4 Рос. форума.* – М., 2004. – С. 602–603.
3. Гуртовой, Б.Л. Применение антибиотиков в акушерстве и гинекологии / Б.Л. Гуртовой, В. И. Кулаков, С. Д. Воропаева. – 2-е изд., доп. и испр. – М.:Триада-X, I.S, 2004. – 176 с.
4. Доброхотова, Ю. Э. Неразвивающаяся беременность: учебно-методическое пособие / Ю. Э. Доброхотова, Т. Н. Савченко; под ред. О. В. Макарова. – М.: РГМУ, 2002. – С. 5–10.
5. Ковальский, Г.Б. Количественная гистохимия дегидрогеназ // Введение в количественную гистохимию ферментов / Г. Б. Ковальский, Т. В. Журавлева, Р. А. Прочуханова; под ред. Т. В. Журавлевой, Р. А. Прочухановой. – М.: Медицина, 1978. – 58 с.
6. Лис, Р.Е. Влияние бактериального липополисахарида продигозана на антенатальный нейрогенез коры больших полушарий плодов белых крыс / Р. Е. Лис, Ю.И. Бандажевский // *Изв. АН БССР. Сер. биол. наук.* – 1986. – № 4. – С. 76–79.
7. Лойда, З. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. – М.: Мир, 1982. – 272 с.
8. Тромбофилические состояния в акушерской и гинекологической практике / А.Д. Макацария [и др.] // *Новые технологии в акушерстве и гинекологии: матер. науч. фор.* – М., 1999. – С. 239–47.
9. Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов / С. В. Оковитый. – ФАРМиндекс-Практик, 2003. – № 5. – С. 85–111.
10. Поплавская, Е.А. Эмбриотропное действие бактериальных липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов (*E. coli* и *S. marcescens*) при введении их самцам крыс перед спариванием / Е.А. Поплавская, Р.Е. Лис // *Журн. ГрГМУ* – 2007. – № 1. – С. 165–66.
11. Поплавская, Е.А. Влияние бактериальных липополисахаридов *E. coli* и *S. marcescens*, введенных самцам крыс перед спариванием, на показатели пре- и постимплантационной гибели и развитие плодов / Е. А. Поплавская, Р. Е. Лис // *Новости мед.-биол. наук. News of biomedical sciens.* – 2012. – Т. 6, № 4. – С. 140–44.
12. Черных, В. Что такое репродукция. Мужское бесплодие // *Журн. 9 месяцев.* – № 9. – 2005. – С. 1–3.
13. Aly, H.A. Mitochondrial dysfunction induced impairment of spermatogenesis in LPS-treated rats: modulatory role of lycopene / H.A. Aly, H.A. El-Beshbishy, Z.M. Banjar // *Eur J Pharmacol.* – 2012. – Vol. 677, N 1-3. – P. 31–8.
14. Picciano, M.F. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? / M.F. Picciano // *Am J Clin Nutr.* – 2000. – Vol. 71, N 4. – P. 857–58.

Поступила 08.10.2013 г.

Принята в печать 06.12.2013 г.

## Сведения об авторах:

Поплавская Е.А. – ассистент кафедры гистологии, цитологии, эмбриологии УО «ГрГМУ»;  
Лис Р.Е. – к.б.н., ассистент кафедры гистологии, цитологии, эмбриологии УО «ГрГМУ».

Адрес для корреспонденции: 230021, г. Гродно, ул. Белые Росы, 71А-42. Тел.моб.: +375 (29) 580-72-02, e-mail: Len.poplavska@mail.ru – Поплавская Елена Александровна.