



ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ КРЫС ПРИ АЗОСПЕРМИИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕТА-ИЗЛУЧЕНИЯ В ДОЗАХ 2 И 8 ГРЭЙ

^{1,2,3}Демяшкин Г.А., ²Цибулевский А.Ю., ¹Недорузов А.А., ²Батов М.А., ¹Щекин В.И.

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва; ³Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, Обнинск, Россия, e-mail: dr.dga@mail.ru

Для цитирования:

Демяшкин Г.А., Цибулевский А.Ю., Недорузов А.А., Батов М.А., Щекин В.И. Особенности активации апоптоза в клетках семенных канальцев крыс при азооспермии после воздействия бета-излучения в дозах 2 и 8 грэй. *Морфологические ведомости*. 2021;29(3):558. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(3\).558](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(3).558)

Резюме. Развитие бесплодия у самцов крыс под воздействием высоких доз ионизированного излучения обусловлено не только прямым повреждением клеток, но и блоком дифференцировки и индукцией апоптоза созревающих сперматогоний. Однако литературные данные по активности биологических медиаторов внутреннего и внешнего пути апоптоза после облучения бета-частицами, в частности, разными эффективными дозами, крайне ограничены. Цель исследования: изучение молекулярно-биологических механизмов апоптоза в семенных канальцах самцов крыс после облучения электронами в дозе 2 и 8 грэй. Самцы крыс Wistar (220±20 г; 9 – 10 недель; n=40) были поделены на 3 группы: I – контрольная (n=10); II – облучение электронами, доза 2 грэй (n=15); III – облучение электронами, доза 8 грэй (n=15). На срезах семенников толщиной 8 мкм определяли экспрессию мРНК каспаз CASP8 и CASP9 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Апоптотическую фрагментацию ДНК выявляли методом TUNEL с подсчетом TUNEL-положительных ядер. На 50-й день после начала эксперимента обнаружили значительное число апоптотических клеток в группах крыс, подвергнутых ионизирующему облучению. Относительное количество TUNEL-положительных клеток сперматогенного эпителия в группе 8 грэй составило 56±1,2% по сравнению с группой 2 грэй – 37±0,9% (p<0.01). В контрольной группе регистрировали 10±1,1% TUNEL-положительных клеток. В группе 8 грэй экспрессия CASP9 была выше, чем в группе 2 грэй (5,83±0,48 против 4,1±0,41 (p<0.01). Экспрессия CASP8 статистически значимо не отличалась между контрольной и экспериментальными группами. В проведенном нами экспериментальном исследовании получены данные, свидетельствующие о дозозависимом эффекте бета-излучения на индукцию апоптоза в семенных канальцах крыс. Установлено, что преимущественная активация апоптоза после воздействия бета-частиц обусловлена внутренним путем с избыточной активацией каспазы-9 и, по всей вероятности, связана с нарушением целостности и функции митохондрий.

Ключевые слова: сперматогенез; апоптоз; каспазы; β-излучение; крысы

Статья поступила в редакцию 05 мая 2021
Статья принята к публикации 22 декабря 2021

THE FEATURES OF APOPTOSIS ACTIVATION IN SEMINIFEROUS TUBULE CELLS OF RATS WITH AZOOSPERMIA AFTER EXPOSURE OF BETA-RADIATION AT DOSES OF 2 AND 8 GRAY

^{1,2,3}Demyashkin GA, ²Tsybulevsky AYU, ¹Nedorubov AA, ²Batov MA, ¹Shchekin VI

¹Sechenov First Moscow State Medical University; ²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; ³National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russia, e-mail: dr.dga@mail.ru

For the citation:

Demyashkin GA, Tsybulevsky AYU, Nedorubov AA, Batov MA, Shchekin VI. The features of apoptosis activation in seminiferous tubule cells of rats with azoospermia after exposure of beta-radiation at doses of 2 and 8 Gray. *Morphologicheskie Vedomosti - Morphological newsletter*. 2021;29(3):570. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(3\).570](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(3).570)

Summary. The development of infertility in male rats under the influence of high doses of ionized radiation is caused not only by direct damage to cells, but also by the block of differentiation and the induction of apoptosis of maturing spermatogonia. However, the literature data on the activity of biological mediators of the internal and external pathways of apoptosis after irradiation with beta particles, in particular, with different effective doses, are extremely limited. Objective: to study the molecular biological mechanisms of apoptosis in the seminiferous tubules of male rats after irradiation with electrons at a dose of 2 and 8 Gray. Male Wistar rats (220±20 g; 9-10 weeks; n=40) were divided into 3 groups: Ist - control (n=10); IInd – electron irradiation, dose 2 Gray (n=15); IIIrd - electron irradiation, dose 8 Gray (n=15). The expression of mRNA of caspases CASP8 and CASP9 was determined on sections of testes with a thickness of 8 μm using real-time polymerase chain reaction. Apoptotic DNA fragmentation was detected by the TUNEL method with the calculation of TUNEL-positive nuclei. On the 50th day after the start of the experiment, a significant number of apoptotic cells were found in the groups of rats subjected to ionizing radiation. The relative number of TUNEL-positive cells of spermatogenic epithelium in the 8 Gray group was 56±1,2% compared with the 2 Gray group - 37±0,9% (p<0,01). In the control group, 10±1,1% TUNEL-positive cells were recorded. In the 8 Gray group, the expression of CASP9 was higher than in the 2 Gray group (5,83±0,48 versus 4,1±0,41 (p<0,01). The expression of CASP8 was not statistically significant between the control and experimental groups. In our experimental study, we obtained data indicating a dose-dependent effect of beta radiation on the induction of apoptosis in the seminiferous tubules of rats. It was found that the predominant activation of apoptosis after exposure to beta particles is due to an internal pathway with excessive activation of caspase-9 and, in all likelihood, is associated with a violation of the integrity and function of mitochondria.

Key words: spermatogenesis; apoptosis; caspases; beta radiation; rats

Article received 05 May 2021
Article accepted 22 декабря 2021

Введение. Сперматогенез является комплексным процессом, в основе которого лежит координация митотических и мейотических делений клеток-предшественников с их последующей дифференцировкой. Установлено большое количество факторов, определяющих активацию или угнетение сперматогенеза на разных этапах. Кроме того, показано, что, клетки сперматогенного эпителия крайне чувствительны к экзогенным повреждающим факторам различной химической и физической природы [1]. Это связано, в первую очередь, с высокой митотической активностью незрелых гамет. По этой причине развитие бесплодия у мужчин после воздействия химио- или радиотерапии остается актуальной проблемой в сохранении мужской фертильности, а также лечения злокачественных новообразований яичек [1-2].

В экспериментальных исследованиях показано, что ионизирующее облучение семенников в дозах от 0,1 Грэй и выше инициирует развитие азооспермии, ведущей к временному или перманентному бесплодию [3]. Негативный эффект облучения на сперматогенный эпителий преимущественно обусловлен первичным повреждением клеточных структур и двухцепочечными разрывами ДНК. Наибольшую чувствительность к прямому повреждению проявляют активно пролиферирующие сперматогонии В, в то время как сперматогонии А менее чувствительны к ионизирующему излучению, но подвержены вторичному повреждению ДНК. Образующиеся в условиях облучения активные формы кислорода (далее -АФК), обладающие, как известно, выраженными цитотоксическими мутагенными свойствами, приводят к возникновению апуриновых/апириимидиновых сайтов и одноцепочечным разрывам в молекулах ДНК [3-4]. Сохранившиеся после облучения сперматогонии А могут достаточно быстро восстановить пул активно делящихся сперматогоний, количество которых будет достаточно для поддержания адекватного уровня сперматогенеза. Однако, часть сперматогоний подвергается блоку дифференцировки в течение длительного времени [5]. Накопление мутаций в «спя-

щих» сперматогониях повышает вероятность нарушений пролиферации и дифференцировки на последующих этапах сперматогенеза. В случае индукции апоптоза в поврежденных клетках сперматогенного эпителия восстановление адекватного уровня сперматогенеза задерживается даже после снятия блока дифференцировки сперматогоний [3, 5-6].

Прямая связь между дозой облучения семенника и степенью его морфологических повреждений установлена достоверно, однако изменения пролиферативно-апоптотического индекса подробно не исследовались. Является ли эффект отсроченной активации апоптоза в созревающих гаметах на разных этапах сперматогенеза дозозависимым и если да, то в какой степени, остается неизученным. Также неизвестно, какой путь апоптоза преимущественно обуславливает отсроченную гибель после восстановления активности сперматогоний.

Цель исследования: изучение особенностей молекулярно-биологических механизмов активации апоптоза в семенных канальцах самцов крыс после облучения электронами в дозе 2 и 8 Грэй.

Материалы и методы исследования. В настоящем исследовании для первичной оценки апоптоза клеток сперматогенного эпителия крыс после облучения дозами в 2 и 8 Грэй применяли метод TUNEL с проведением иммуофлюоресцентной микроскопии. Также определяли экспрессию мРНК каспазы-8 (далее - CASP8) и каспазы-9 (далее - CASP9) для определения активности наружного и внутреннего путей апоптоза, соответственно. Самцов крыс Wistar (220±20 грамм; возраста 9–10 недель; n=40) содержали в виварии при контролируемой температуре (21°C) и световом периоде со свободным доступом к воде и корму. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: I – контрольные (n=10); II – подвергнутые облучению электронами в дозе 2 Грэй (n=15); III – подвергнутые облучению электронами в дозе 8 Грэй (n=15).

Крысам I группы вводили 0,9% физиологический раствор NaCl интраперитонеально на протяжении всего эксперимента. Животных II и III групп (n=30) под-

вергали однократному прицельному облучению электронами тазово-брюшного сегмента с использованием линейного акселератора («NOVAC-11», мощность дозы 1 Грэй/мин) в первый день эксперимента в дозах 2 Грэй и 8 Грэй, соответственно. Животных всех групп выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика на 50-е сутки.

Все манипуляции осуществляли согласно Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ЕЭС, Страсбург, 1986), Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS) и Правилам лабораторной практики и приказу Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики», исследования были также одобрены локальным этическим комитетом.

Срезы, полученные из фрагментов семенников, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (далее - PBS) 15-20 минут при 20°C, после чего обрабатывали 100 мкл раствором протеиназы К с концентрацией 20 мкг/мл и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем проводили отмывку, погрузив предметные стекла в PBS на 5 минут при комнатной температуре. Далее добавляли 50 мкл окрашивающего раствора TdT (ThermoFisher, USA) и инкубировали 60 минут при 37°C. Затем проводили удаление рабочего раствора TdT и промывание в PBS. Далее добавляли монтажную среду с DAPI (ThermoFisher, USA) и контролировали, применяя флуоресцентный микроскоп и регулируя интенсивность флуоресценции набором фильтров FITC.

Фрагменты аутоптов семенников помещали в стабилизирующий раствор и хранили при -70°C до проведения исследования. Образцы подвергали гомогенизации согласно стандартному протоколу. Экстракцию тотальной РНК производили с использованием набора готовых реакти-

вов RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли с помощью SuperScript™ VILO™ Master Mix (Invitrogen). Выделенные кДНК подверглись полимеразной цепной реакции в реальном времени (далее - ПЦР-РВ) с использованием готовой смеси реагентов Absolute Blue QPCR Mix (Thermo Scientific, США) с SYBR Green I. ПЦР-РВ проводилась с использованием StepOne System (Applied Biosystems, США) и штатного программного обеспечения.

Анализ экспрессии генов проведен с использованием метода определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии генов согласно протоколу [7]. Контроль выполнен относительно референсного гена домашнего хозяйства GAPDH. Подбор праймеров был осуществлен на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием Primer-BLAST. Сравнение между группами проводилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA со статистической значимостью на уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Апоптотический статус в образцах семенников крыс оценивали в группе контроля, 2 Грэй и 8 Грэй. Во всех группах апоптотическая фрагментация ДНК обнаруживались в пределах сперматогенного эпителия преимущественно в сперматоцитах. В группе 8 Грэй относительное количество TUNEL-положительных клеток в сперматогенном эпителии семенных канальцев на 21 сутки было значительно достоверно выше ($p < 0,01$) группы 2 Грэй, $56 \pm 1,2\%$ и $37 \pm 0,9\%$. В контрольной группе регистрировали $10 \pm 1,1\%$ TUNEL-положительных клеток (рис. 1).

Относительная экспрессия CASP9 была статистически значимо выше в экспериментальных группах по сравнению с контролем ($p < 0,01$). В группе 8 Грэй экспрессия CASP9 была выше, чем в группе 2 Грэй ($5,83 \pm 0,48$ против $4,1 \pm 0,41$; $p < 0,01$). Экспрессия CASP8 статистически значимо не отличалась между контрольной и экспериментальными группами (рис. 2).

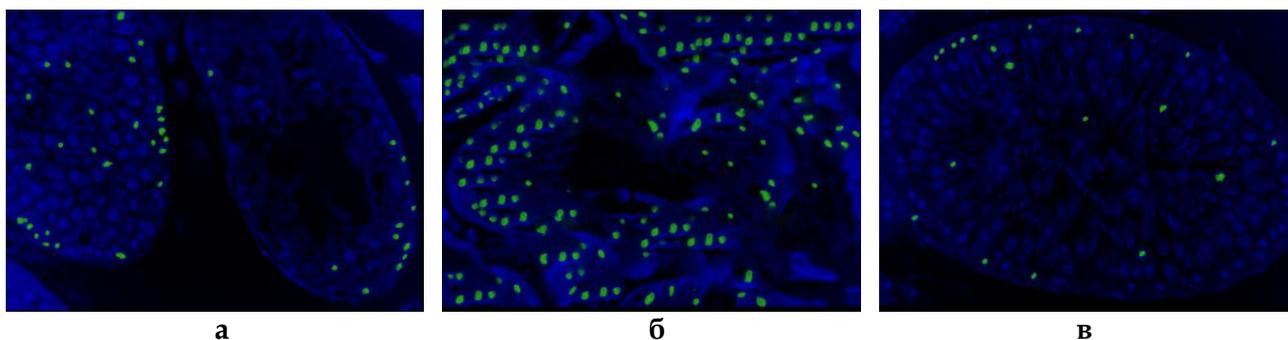


Рис. 1. TUNEL-позитивные клетки в семенных канальцах крыс после облучения дозами 2 Грэй (а), 8 Грэй (б) и в контрольной группе (в). Окр.: флюоресцентная микроскопия. Ув.: x400.

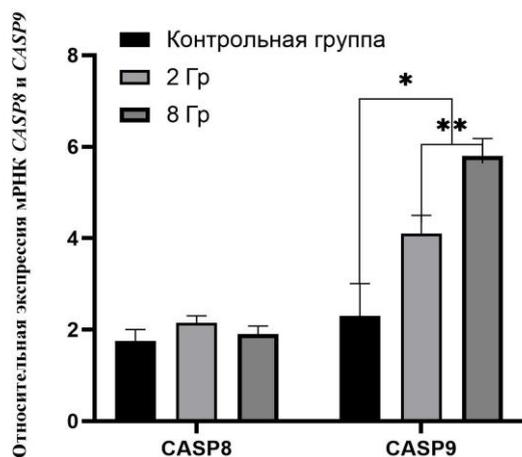


Рис. 2. Диаграмма относительной экспрессии мРНК CASP8 и CASP9 в образцах семенных канальцев крыс контрольной группы и после воздействия ионизирующего излучения (в условных единицах). Обозначения: * – статистически значимая разница между контрольной и экспериментальными группами; ** – статистически значимая разница между группами 2 Грэй и 8 Грэй.

Митохондрии, как известно, являются основным источником АФК в клетках. Окислительный стресс и сопряженная с ним гиперпродукция АФК непосредственно связаны с индукцией апоптоза во многих типах клеток, в том числе и сперматогенного эпителия [1]. Кроме того, оксид азота действует на митохондрии и индуцируя митохондриально-зависимый апоптоз способствует гибели сперматогоний А при старении у крыс [11-12]. Таким образом, нормализация функции митохондрий может привести к существенному снижению уровня АФК в клетках.

Ряд ключевых событий в период апоптоза, вызванного ионизирующим излучением, связаны с изменением митохондриальной активности и их целостности: снижением производства АТФ, увеличением выработки АФК, увеличением проницаемости митохондриальной мембраны, а также высвобождением цитохрома С, апоптоз-индуцирующего фактора и, наконец, каспаз в цитоплазму клетки. Все эти изменения обуславливают нарушение функции и структурное повреждение митохондрий [13].

Принимая во внимание преимущественное влияние ионизирующего излучения на митохондрии, предполагалось получение результатов, указывающих на преимущественную активации внутреннего пути апоптоза в этих условиях, что характеризуется повышением экспрессии CASP9. Отсутствие значимой активации CASP8, вероятнее всего, связано с иммунной привилегированностью сперматогенного эпителия и отсутствием значимого влияния внешнего пути на индукцию апоптоза в клетках сперматогенного эпителия. Также в ряде исследований установлена корреляция между снижением активности антиапоптотического гена BCL-2 и повышением экспрессии CASP9, что указывает на необходимость изучения про- и антиапоптотического соотношения экспрессии ключевых генов под воздействием ионизирующего излучения [14].

Результаты реакции, полученной методом TUNEL, указывают на дозозависимый характер активации апоптоза в сперматогониях и сперматоцитах при воз-

действию бета-излучения, однако не исключено, что избыточная активация апоптоза при более высоких дозах излучения является не только следствием накопления ошибок ДНК, но и прямым повреждающим действием на клеточные структуры. На это указывает значительное изменение структуры семенника после облучения в дозе 8 Грэй. Очевидно, что для всесторонней оценки возможности и сроков восстановления сперматогенного эпителия под воздействием различных доз ионизирующего излучения необходимо дальнейшее углубленное исследование.

Заключение. В проведенном нами исследовании получены данные, свиде-

тельствующие о дозозависимом эффекте бета-излучения на индукцию апоптоза в семенных канальцах крыс. Установлено, что преимущественная активация апоптоза после воздействия бета частиц обусловлена внутренним путем и, вероятно, связана с нарушением целостности и функции митохондрий. Повышение экспрессии CASP9 в группе крыс с наибольшей лучевой нагрузкой по сравнению с группой животных с меньшей дозой облучения указывает на возможную корреляцию между поглощенной дозой ионизирующего излучения и степенью повреждения митохондрий.

Литература References

1. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril.* 2013;100(5):1180-1186. DOI:10.1016/j.fertnstert.2013.08.010
2. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(3):309-319. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.06.010
3. Liu G, Gong P, Zhao H, Wang Z, Gong S, Cai L. Effect of low-level radiation on the death of male germ cells. *Radiat Res.* 2006;165(4):379-389. DOI:10.1667/rr3528.1
4. Abuelhija M, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML. Rat models of post-irradiation recovery of spermatogenesis: interstrain differences. *Andrology.* 2013.1(2):206-215.
5. Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):149-158. DOI:10.1002/jcp.20910
6. Fang F, Gong PS, Zhao HG et al. Mitochondrial modulation of apoptosis induced by low-dose radiation in mouse testicular cells. *Biomed Environ Sci.* 2013;26(10):820-830. DOI:10.3967/bes2013.005
7. Schmittgen T, Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3: 1101-1108.
8. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J.* 2002;365(Pt 3):849-856. DOI:10.1042/BJ20020254
9. Amanpour P, Khodarahmi P, Salehipour M. Protective effects of vitamin E on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2020;393(3):349-358. DOI:10.1007/s00210-019-01736-w
10. Marouani N, Tebourbi O, Hallègue D et al. Mechanisms of chromium hexavalent-induced apoptosis in rat testes. *Toxicol Ind Health.* 2017;33(2):97-106. DOI:10.1177/0748233715600333
11. Taneli F, Vatansever S, Ulman C et al. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta Histochem.* 2005;106(6):459-466. DOI:10.1016/j.acthis.2004.11.001
12. Hikim AP, Vera Y, Vernet D et al. Involvement of nitric oxide-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in germ cell apoptosis in male Brown-Norway rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005;60(6):702-708. DOI:10.1093/gerona/60.6.702
13. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:157-183. DOI:10.1007/978-94-007-2869-1_7
14. Silva AM, Correia S, Casalta-Lopes JE et al. The protective effect of regucalcin against radiation-induced damage in testicular cells. *Life Sci.* 2016;164:31-41. DOI:10.1016/j.lfs.2016.09.003

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Демяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва; ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии, Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, Обнинск, Россия;
e-mail: dr.dga@mail.ru

Grigory A. Demyashkin, Candidate of Medical Sciences, Assistant Professor of Academician Strukov Department of Pathological Anatomy of the Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; Leading Scientific Employee of the Department of Pathological Morphology of National Medical Research Centre of Radiology, Obninsk, Russia;
e-mail: dr.dga@mail.ru

Цибулевский Александр Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Российский национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия;
e-mail: auts77@gmail.com

Alexandr Yu. Tsybulevsky, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russia;
e-mail: auts77@gmail.com

Недорубов Андрей Анатольевич, руководитель центра доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия;
e-mail: nedorubov.ras@gmail.com

Andrey A. Nedorubov, Head of the Centre of Preclinical Research of the Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia;
e-mail: nedorubov.ras@gmail.com

Батов Максим Александрович, студент, Российский национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия;
e-mail: m.batov112@gmail.com

Maksim A. Batov, Student of the GP Faculty of the Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russia;
e-mail: m.batov112@gmail.com

Щекин Владимир Иванович, студент, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия;
e-mail: shekin.vova@mail.ru

Vladimir I. Shchekin, Student of the Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia;
e-mail: shekin.vova@mail.ru