

следуемой сыворотки. Таким образом, конечный результат исследования ХС будет во многом определяться факторами замораживания, размораживания и длительности хранения. При этом результат может быть как завышен за счет свободнорадикального окисления компонентов сыворотки (плазмы) крови и продукции пероксида водорода, так и занижен как результат нарушения стерических взаимодействий окисленных форм холестерина с ферментами диагностического набора.

Учитывая вышеизложенное, можно заключить, что для снижения ошибок в определении клинико-лабораторных показателей необходима разработка стандартных процедур забора, хранения и обработки биологического материала во всех клинических лабораториях, что подразумевает систему аккредитации клинико-лабораторной службы.

#### **Выводы**

1. Замораживание сыворотки крови искажает конечный результат исследования содержания общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности.

2. Искажение результатов может быть обусловлено нарушением взаимодействия окисленных форм холестерина с активным центром ферментов, включенных в диагностический набор.

#### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. *Меньшиков, В. В.* Аналитическая достоверность клинической лабораторной информации и роль эталонов в ее обеспечении / В. В. Меньшиков // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 12. — С. 52–61.
2. Исследование свободнорадикальных процессов в организме крыс на фоне изменения состояния внешней среды / К. В. Кулакова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. — 2010. — Т. 1, № 4. — С. 100–108.
3. *Kreit, J.* Cholesterol oxidase: physiological functions / J. Kreit, N. S. Sampson // FEBS J. — 2009. — Vol. 276, № 23. — P. 6844–6856.
4. *Белоус, А. М.* Биохимическая модификация липидов биомембран как причина гибели клеток при низкотемпературном консервировании / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко // Криобиология и криомедицина. — 1978. — № 4. — С. 3–6.
5. *Xu, L.* Free radical oxidation of cholesterol and its precursors: Implications in cholesterol biosynthesis disorders / L. Xu, N. A. Porter // Free Radic. Res. — 2015. — Vol. 49, № 7. — P. 835–849.
6. Хавкин, Э. Органические перекиси, их получение и реакции / Э. Хавкин. — М., Ленинград: Химия, 1961. — 536 с.
7. *Логинова, О. Н.* Влияние условия замораживания водной среды на скорость разложения пероксида водорода при участии ионов железа(II) / О. Н. Логинова, Н. А. Казанцева // Химия, биология, биотехнологии в современном мире, теория и практика — Москва, 26–30 июня 2013 г.: сб. матер. междунар. конф. и е-симпозиума; [ред. соп. : Г. В. Печурин (пред.) и др.]. — С. 110–113.
8. *Friedewald, W. T.* Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge / W. T. Friedewald, R. I. Levy, D. S. Fredrickson // Clinical Chemistry. — 1972. — Vol. 18, № 6. — P. 499–502.
9. Электронный ресурс. — Режим доступа: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1COY>. — Дата доступа: 21.11.2016.
10. *Кузьменко, В. В.* Повышение точности расчетных показателей холестерина (липопротеинов низкой плотности) в сыворотке крови / В. В. Кузьменко, Р. Г. Скворцова, И. А. Мирошниченко // Сибирский медицинский журнал. — 2010. — № 6. — С. 87–89.

*Поступила 30.12.2016*

УДК 616.681-018-092.18/-092.19-092.9 (отред)

### **ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТКАНЕЙ СЕМЕННИКОВ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР**

*К. А. Кидун, Е. К. Солодова, Т. С. Угольник*

**Гомельский государственный медицинский университет**

Стресс оказывает неблагоприятное воздействие на мужскую репродуктивную систему. Целью работы было изучить морфологические изменения в тканях семенников крыс линии Вистар при хроническом стрессе по Ortiz. В семенниках крыс после перенесенного стресса было выявлено полнокровие сосудов, уменьшение диаметра ИСК, отслоения сперматогенного эпителия от базальной мембраны, а также изменения в сперматогенном эпителии деструктивного характера, вплоть до развития некроза.

Ключевые слова: семенники, крысы, стресс, сперматогенный эпителий.

### **THE EFFECTS OF CHRONIC STRESS ON THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TESTICULAR TISSUES OF WISTAR RATS**

*K. A. Kidun, E. K. Solodova, T. S. Ugolnik*

**Gomel State Medical University**

Stress has an unfavorable effect on male reproductive system. The aim of the work was to study the morphological changes in testicular tissues of Wistar rats in chronic stress according to Ortiz. We detected hyperemia of vessels, reduction of the diameter of seminiferous tubules, exfoliation of the seminiferous epithelium from the basement membrane, and also destructive changes in the seminiferous epithelium including development of necrosis in the testis of the rats after stress.

Key words: testis, rats, stress, seminiferous epithelium.

#### **Введение**

Сперматогенез является одним из наиболее динамичных процессов в организме чело-

века и наиболее чувствительным к действию повреждающих факторов вследствие его высокой пролиферативной активности. Различные

виды стресса могут оказывать неблагоприятное воздействие на состояние мужской репродуктивной системы и фертильность [1]. Было показано, что хронический иммобилизационный стресс (1 час в день на протяжении 12 суток) приводит к нарушению тестикулярного стероидогенеза и вызывает апоптоз сперматогоний, обусловленный усиленным действием глюкокортикоидов на ткань яичек [2]. Шестидневный тепловой стресс вызывает микроструктурные изменения в клетках яичка, нарушение клеточных интегративных связей с последующим апоптозом половых клеток [3]. Описанные выше виды стрессовых факторов помимо неспецифического стрессового воздействия могут вносить свой специфический компонент.

#### **Цель работы**

Изучить морфологические изменения в тканях семенников крыс линии Вистар при хроническом стрессе по Ortiz.

#### **Материал и методы**

Экспериментальное исследование было выполнено на 102 половозрелых самцах крыс линии Вистар в возрасте 5–6 месяцев. Животные находились в стандартных условиях вивария. Крысы были разделены на 2 группы: интактные животные составили группу контроля ( $n = 31$ ), опытная группа ( $n = 71$ ) была подвергнута хроническому стрессу по Ortiz [4]. В течение эксперимента животные опытной группы ежедневно подвергались воздействию двух стрессоров, чередующихся в случайном порядке: вращение в клетке в течение 50 минут со скоростью 60 об/мин, принудительное плавание в холодной воде (4 минуты при температуре 11–12 °С), помещение в темную холодильную камеру с температурой 4–5 °С в течение 60 минут, яркое освещение в ночное время, отсутствие света в дневное время, изоляция в индивидуальных клетках на ночь, иммобилизация в индивидуальных пластиковых контейнерах со свободным доступом воздуха в течение 60 минут, лишение воды и пищи на 12-часовой период. Случайность чередования стрессоров снижала степень привыкания экспериментальных животных к воздействиям и способствовала минимизации специфического компонента. Продолжительность эксперимента составила 10 дней. Экспериментальная работа проводилась в соответствии с Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным [5]. Животные выводились из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом.

Для гистологического анализа были забраны образцы тканей семенников в индивидуальные емкости с забуференным формалином. Семенники фиксировали по Лилли (в 10 % нейтральном забуференном формалине) в те-

чение 24 часов при комнатной температуре. Затем проводили гистологическую проводку с использованием изопропилового спирта, заливали в парафин [6]. Изготавливали поперечные серийные срезы толщиной 6 мкм на микротоме Leica RM 2125 (Германия). Препараты, окрашенные гематоксилином (по Майеру) и эозином, заключали в полистирол под покровное стекло.

Морфологические исследования семенников проводили с использованием светового микроскопа «Nicon Eclipse 50i» (Япония) при общем увеличении  $\times 40$ ,  $\times 400$ .

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ «Statsoft (USA) Statistica», 8. Так как распределение изучаемых параметров отличалось от нормального (тест Шапиро-Уилка), для анализа различий между двумя независимыми группами по количественным показателям применяли критерий Манна-Уитни (U, Z). Данные приведены в виде Me (Q1; Q3), где Me — медиана, Q1; Q3 — верхний и нижний квартиль. Различия между изучаемыми показателями считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$  [7].

#### **Результаты и обсуждение**

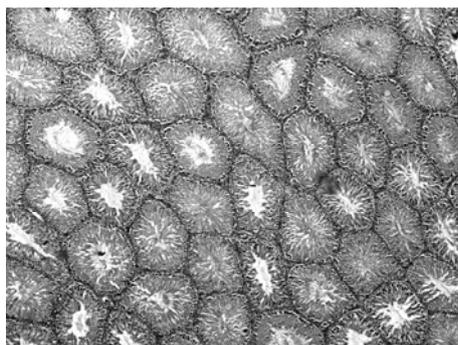
Животные контрольной группы имели вес 300 (280; 320) г. Крысы опытной группы на момент окончания эксперимента имели более низкую массу тела — 265 (240; 280) г по сравнению с интактными животными, различия статистически значимы,  $p < 0,05$ .

Вес семенников у животных опытной группы составил 2,1 (1,9; 2,2) г и был статистически значимо меньше, чем у крыс контрольной группы — 2,5 (2,4; 2,7) г,  $p < 0,05$ .

Различия весовых показателей может быть объяснено непосредственным действием стрессовых факторов, а также особенностями модели хронического стресса по Ortiz, который предусматривает неоднократное лишение опытных животных пищи.

При микроскопическом исследовании гистологическая картина ткани яичек у крыс контрольной группы соответствовала норме (рисунок 1).

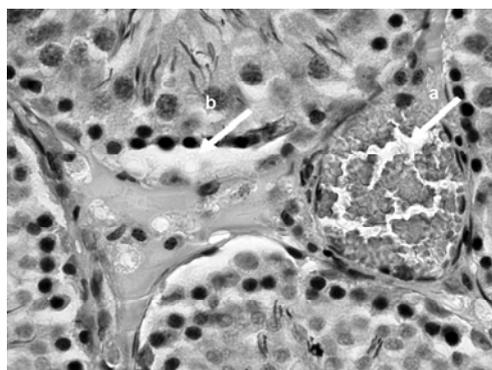
На рисунке 1 продемонстрирована гистологическая картина семенников крыс контрольной группы, где визуализируются округлые, компактно расположенные извитые семенные канальцы (ИСК) в поперечном сечении. Между ними видны равномерные прослойки межтубулярной рыхлой волокнистой соединительной ткани — интерстиций — с кластерами эндокриноцитов (клетки Лейдига), расположенными вокруг сосудов микроциркуляторного русла. Стенки ИСК образованы сперматогенным эпителием, в котором половые клетки расположены в соответствии со стадиями сперматогенеза и в тесной взаимосвязи с поддерживающими клетками Сертоли.



**Рисунок 1** — Срез семенника крысы контрольной группы  
Окраска: гематоксилином и эозином, увеличение:  $\times 40$

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов семенников крыс, подвергнутых воздействию хронического стресса, были выявлены выраженные морфологические изменения в интерстициальной ткани и

ИСК органа. Так, у животных, перенесших хронический стресс, сосуды, в том числе относящиеся к микроциркуляторным, находились в состоянии умеренного, а иногда и выраженно-го полнокровия (рисунок 2).



**Рисунок 2** — Полнокровный сосуд (а) и отслоения сперматогенного эпителия от базальной мембраны ИСК (b) в семеннике крысы опытной группы  
Окраска: гематоксилином и эозином, увеличение:  $\times 400$

У большинства животных опытной группы, в отличие от группы контроля, в ткани семенников определялись значительные участки с резко уменьшенными в диаметре ИСК. Сжатие ИСК сопровождалось появлением в ткани яичка оптически пустых пространств между стенками ИСК и соединительнотканными перегородками органа

(рисунок 3). Участки с резким снижением диаметра ИСК определялись как в центральной части, так и по периферии среза органа. Подобные морфологические изменения в семенниках стрессированных 60- и 90-суточным воздействием шума крыс были показаны в исследованиях группы ученых во главе с G. S. Chandralekha [8].



**Рисунок 3** — Участок ткани семенника с уменьшением диаметра ИСК крысы опытной группы  
Окраска: гематоксилином и эозином, увеличение:  $\times 40$

В исследовании G. Hou с соавторами на модели хронического неспецифического 35-дневного стресса было показано уменьшение диаметра ИСК и снижение толщины герминативного слоя. Также в работе данных авторов отмечалось, что хронический стресс у крыс приводит к повреждению и истончению базальной мембраны ИСК с образованием пустот между стенками ИСК и соединительнотканными перегородками [9]. Исследование N. Pashaeian с соавторами, использовавшими модель 2-часовой иммобилизации в течение 15 дней, показывает аналогичные изменения в тканях семенников: уменьшение диаметра ИСК и толщины их стенок, отслоение и отрыв клеток сперматогенного эпителия от базальной мембраны [10].

В нашем исследовании у животных опытной группы также регистрировались локаль-

ное, а иногда и тотальное отделение сперматогенного эпителия от базальной мембраны (рисунок 2). Данные изменения в базальной мембране ИСК могут быть обусловлены ее дезорганизацией в результате хронического стресса и, как следствие, приводить к повреждению клеток сперматогенного эпителия.

В ИСК крыс, перенесших хронический стресс, отмечались выраженные явления деструктивного характера со стороны сперматогенного эпителия вплоть до явлений тестикулярного некроза. Деструктивные изменения сперматогенного эпителия заключались в нарушениях интегративных связей между клетками Сертоли и развивающимися половыми клетками, которые приводили к их разобщению с появлением более и менее выраженных пустот между клетками сперматогенного эпителия (рисунок 4).

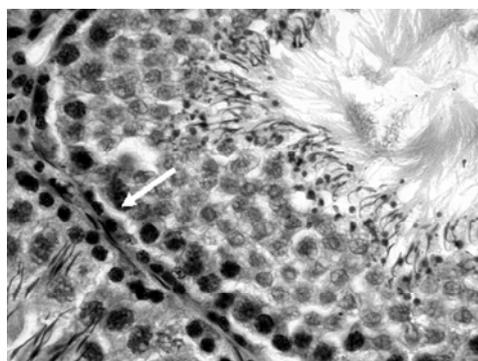


Рисунок 4 — Дезинтеграция клеток сперматогенного эпителия у крысы опытной группы  
Окраска: гематоксилином и эозином, увеличение: ×400

На наш взгляд, данные морфологические изменения могут быть связаны с повреждением клеточных мембран сперматогенного эпителия и, как следствие, деструкцией межклеточных контактов у животных опытной группы. В дальнейшем подобные изменения могут приводить к нарушению сперматогенеза и последующему изменению фертильности.

#### Заключение

У самцов крыс линии Вистар, перенесших 10-дневный хронический стресс по Ortiz, наблюдаются изменения морфологии в семенниках и нарушения кровоснабжения органа. Было выявлено полнокровие сосудов, уменьшение диаметра извитых семенных канальцев, отслойки сперматогенного эпителия от базальной мембраны, а также изменения в сперматогенном эпителии деструктивного характера, вплоть до развития тестикулярного некроза.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кидун, К. А. Морфологические изменения тканей семенников у самцов беспородных белых крыс при остром иммобилизационном стрессе / К. А. Кидун, Р. В. Дорошенко, Т. С. Угольник // Проблемы здоровья и экологии. — 2013. — № 3(37). — С. 97–101.

2. Testicular germ cells apoptosis following exposure to chronic stress in rats / M. K. Kheirabad [et al.] // Asian Pacific Journal of Reproduction. — 2016. — Vol. 5, № 5. — P. 371–375.

3. Kanter, M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study / M. Kanter, C. Aktas, M. Erboğa // Toxicol Ind Health. — 2011. — Vol. 29 (2). — P. 99–113.

4. Effect of stress in the mesolimbic dopamine system / J. Ortiz [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 1996. — Vol. 14, № 6. — P. 443–452.

5. Хельсинская декларация всемирной медицинской ассоциации: этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследования (Сеул, 2008) / Морфология. — 2010. — Т. 4, № 2. — С. 69–72.

6. Пешков, М. В. Метод гистологической проводки тканей с использованием изопропанола и минерального масла / М. В. Пешков, И. И. Дыгало // Архив патологии. — 2009. — № 3. — С. 39–41.

7. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера, 2003. — 312 с.

8. Chandrlekha, G. S. Noise exposure effect on testicular histology, morphology and on male steroidogenic hormone / G. S. Chandrlekha, R. Jeganathan, J. C. Charan // Malaysian J. Med. Sciences. — 2007. — Vol. 14. — P. 28–35.

9. Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats / G. Hou [et al.] // J. Sex. Med. — 2014. — Vol. 11. — P. 653–663.

10. Pashaeian, N. Study of the effect of ginseng on testicular function after immobilization stress in rat / N. Pashaeian, S. E. Safavi, M. N. Gharamaleki // Int. J. Biosci. — 2015. — Vol. 6, № 4. — P. 184–191.