

У здоровых пациентов (группа 4) локальные дефекты СНВС в верхнем и нижнем секторах не были обнаружены ни в одном случае.

Выводы

1. Проведенный статистический анализ показал, что локальные дефекты СНВС встречались значимо чаще у пациентов с ПОУГ, чем у пациентов, не имеющих данного заболевания ($p < 0,05$).

2. У пациентов с ПОУГ как в группе 1, так и в группе 2 отмечалось увеличение количества локальных дефектов СНВС при увеличении стадии глаукомы, исключение составили пациенты подгрупп Г3 и Г4, где частота локальных дефектов в нижнем секторе была одинаковой.

3. У пациентов с ПОУГ на фоне миопической рефракции количество локальных дефектов СНВС было значимо больше в верхнем секторе по сравнению с нижним во всех стадиях глаукомного процесса ($p < 0,001$). Это свидетельствует о преимущественном поражении верхнего сектора перипапиллярной сетчатки у пациентов с ПОУГ на фоне миопической рефракции.

4. У пациентов с ПОУГ в сочетании с гиперметропией локальные дефекты СНВС значимо чаще обнаруживались в нижнем секторе при I и II стадиях глаукомы ($p < 0,05$), в то время, как при III и IV стадиях частота локальных дефектов в верхнем и нижнем секторах была сопоставима ($p > 0,05$).

5. У пациентов группы 3 не было обнаружено значимых различий в распределении локальных дефектов СНВС в верхнем и нижнем секторах ($p > 0,05$).

6. У здоровых пациентов (группа 4) локальные дефекты СНВС в верхнем и нижнем секторах не были обнаружены ни в одном случае.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Курышева, Н. И.* Глаукомная оптическая нейропатия / Н. И. Курышева. — М.: МЕДпресс-информ, 2006. — 136 с.
2. *Remo, S. Jr.* The Optic Nerve in Glaucoma / S. Jr. Remo. — Rio de Janeiro. «Cultura Medica», 2006. — 404 p.
3. Индикаторы информативности развития глаукомы при структурно-топографическом анализе диска зрительного нерва (на примере изучения результатов лазерной поляриметрии и компьютерной ретинотомографии) / А. В. Куроедов [и др.] // Глаукома. — 2007. — № 3. — С. 10–16.
4. *Mohammadi, K.* Retinal nerve fiber layer thickness measurement with scanning laser polarimetry predict glaucomatous visual field loss / K. Mohammadi, C. Bowd, R. Weinreb // Amer. J. of Ophthalmol. — 2004. — Vol. 138. — P. 592–601.
5. Discrimination between normal and glaucomatous eyes with visual field and scanning laser polarimetry measurements / R. Lauandepimentel [et al.] // British Journal of Ophthalmology. — 2001. — Vol. 85, № 5. — P. 586–591.
6. Optic disc imaging in perimetrixally normal eyes of glaucoma patients with unilateral field loss / J. Caprioli [et al.] // Trans. Am. Ophthalmol. Soc. — 2006. — Vol. 104. — P. 202–211.
7. *Чернякова, Т. В.* Новые технологии в диагностике офтальмологических заболеваний / Т. В. Чернякова // Клиническая офтальмология. Современные методы исследования в офтальмологии. — 2006. — № 2. — С. 54–58.
8. *Джумова, М. Ф.* Структурные изменения слоя нервных волокон сетчатки в различных квадрантах перипапиллярной области при глаукомной оптиконейропатии / М. Ф. Джумова, А. Ю. Чекина, А. А. Джумова // ARS MEDICA. — 2009. — № 9 (19). — С. 56–58.

Поступила 02.09.2015

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 616.69-008.6+616.43-092.9]:616-092.18/-092.19 СОСТОЯНИЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА И ЭНДОКРИННОГО АППАРАТА СЕМЕННИКОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

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

Гомельский государственный медицинский университет

В эксперименте на беспородных крысах-самцах было установлено, что однократный 3-часовой иммобилизационный стресс вызывает в семенниках крыс нарушение процесса сперматогенеза, но не оказывает влияния на относительное количество клеток Лейдига. Установлено, что в условиях однократного кратковременного иммобилизационного стресса в семенниках крыс нарушается соотношение основных морфофункциональных типов клеток Лейдига: увеличивается количество неактивных клеток Лейдига за счет снижения числа активных форм стероидпродуцирующих клеток.

Ключевые слова: крысы, иммобилизационный стресс, семенники, извитые семенные каналы, сперматогенез, клетки Лейдига.

THE STATE OF SPERMATOGENESIS AND ENDOCRINE APPARATUS OF RAT TESTICLES IN ACCUTE IMMOBILIZATION STRESS

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

Gomel State Medical University

The experiment carried out on outbred male rats has showed that one-time 3-hour immobilization stress breaks the spermatogenesis process in testicles of rats but does not change the relative number of Leydig cells. It was found out that the one-time immobilization stress leads to disorders of the main morphofunctional types of Leydig cells — the number of inactive Leydig cells increases due to the reduction of active forms of steroid-secreting cells.

Key words: rats, immobilization stress, testicles, curved seminiferous tubules, spermatogenesis, Leydig cells.

Введение

В последние десятилетия многие исследования посвящены влиянию стресса на организм и его повреждающему эффекту, угрожающему гомеостазу. Образующиеся при стрессе свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов оказывают негативное влияние на морфологические характеристики различных тканей и органов, включая семенники.

Окислительный стресс оказывает влияние на процессы пролиферации и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия, нарушает стероидогенез в клетках Лейдига (КЛ), вызывает гибель мужских половых клеток и эндокриноцитов семенников путем апоптоза, приводя к снижению их численности и функциональной активности [1–6].

Согласно научным данным, иммобилизационный стресс приводит к значительным нарушениям морфологии семенников, и как следствие, к ухудшению состояния сперматогенеза у экспериментальных животных [7, 8, 9]. В то же время морфологические изменения семенников крыс в результате кратковременной иммобилизации изучены недостаточно.

Цель работы

Изучить состояние сперматогенеза, количество КЛ и соотношение их различных форм в семенниках беспородных белых крыс при действии острого 3-часового иммобилизационного стресса.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование было выполнено на 24 половозрелых самцах беспородных белых крыс массой 250 (230; 265) г в возрасте 8–10 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12-часового светового режима дня. Крысы были разделены на 2 группы: опытную ($n = 11$) и контрольную (интактные животные) ($n = 13$). Крыс опытной группы подвергали воздействию острого иммобилизационного стресса. Экспериментальных животных помещали в индивидуальный пластиковый контейнер (ограничивающий движения), подгоняемый под размер животного, со свободным доступом воздуха. Время пребывания крыс в иммобилизаторах составляло 3 ч [10]. С целью нивелирования влияния временного фактора на функциональное состояние животных все исследования проводили в первую половину суток с 8 до 12 часов. Эксперименты на животных проводились в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция — октябрь 2008 г.) [11].

В конце эксперимента животных обеих групп декапитировали. С целью исключения влияния анатомических особенностей кровоснабжения на результат исследования для оценки морфоло-

гических изменений был выбран правый семенник [12].

Семенники фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине (по Лилли) в течение 24 часов при комнатной температуре. Гистологическая проводка производилась с использованием изопропилового спирта [13]. Семенники заливали в парафин и изготавливали поперечные серийные срезы толщиной 5 мкм на микротоме Leica RM 2125 (Германия). Срезы проводили в этиловом спирте и ксилоле, окрашивали гематоксилином (по Майеру) и эозином. Окрашенные препараты заключали в полистирол под покровное стекло.

Изучение микроструктуры семенников проводили на световом микроскопе MINIMED 502 (Россия) при общем увеличении $\times 400$, $\times 1000$

В каждом гистологическом препарате исследовали 100 извитых семенных канальцев (ИСК). Среди них оценивали канальцы с 4 генерациями половых клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды); с 3 генерациями половых клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды); с 2 генерациями половых клеток (сперматогонии, сперматоциты) и с 1 генерацией половых клеток (сперматогонии) [14].

Индекс сперматогенеза рассчитывали по формуле:

$$I = \frac{\sum \alpha}{A},$$

где I — индекс сперматогенеза;

α — количество слоев сперматогенного эпителия, обнаруженных в каждом канальце;

A — количество подсчитанных канальцев [14].

Определяли относительное количество КЛ, приходящихся на поперечный срез одного извитого семенного канальца, и процентное соотношение активных и неактивных форм эндокриноцитов [14]. Относительное количество КЛ рассчитывали у 9 животных опытной группы и у 10 — контрольной.

Активные формы КЛ определяли у 8 животных опытной группы и у 13 — контрольной. КЛ большого и среднего размеров оценивали как активные формы эндокриноцитов, малого размера — как неактивные.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica», 8.0. Проверку на нормальность распределения изучаемых признаков проводили с помощью теста Шапиро — Уилки (W). Поскольку закон распределения большинства исследуемых числовых показателей отличался от нормального, для оценки различий между группами использовали критерий Манна — Уитни (U). Данные в тексте и таблице приведены в виде $Me (Q1; Q3)$, где Me — медиана, $Q1; Q3$ — верхний и нижний квартиль. Различия между показателями считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$ [15].

Результаты и обсуждение

Индекс сперматогенеза, отражающий количество поколений сперматогенных клеток в стенке ИСК, является важнейшим количественным показателем, характеризующим генеративную активность семенника, а его снижение свидетельствует о нарушении процессов сперматогенеза [16, 17].

В исследованиях Ю. Н. Королева с соавт. [7] было продемонстрировано, что однократ-

ное воздействие 6-часового иммобилизационного стресса через сутки приводит к снижению индекса сперматогенеза в семенниках крыс.

В эксперименте нами было установлено, что уже через 3 часа после однократного воздействия иммобилизационного стресса отмечается снижение индекса сперматогенеза у крыс опытной группы по отношению к животным контрольной группы, $p < 0,01$ (таблица 1).

Таблица 1 — Состояние ИСК и индекс сперматогенеза у крыс после острого 3-часового иммобилизационного стресса

Параметры	Опытная группа	Контрольная группа	p
Канальцы с 4 поколениями половых клеток (%)	67,0 (63,5; 69,5)	73,0 (72,0; 75,0)	0,002
Канальцы с 3 поколениями половых клеток (%)	33,0 (29,5; 36,5)	26,0 (24,0; 29,0)	0,008
Канальцы с 2 поколениями половых клеток (%)	0 (0; 0,5)	0 (0; 1,0)	0,469
Канальцы с 1 генерацией половых клеток (%)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,884
Индекс сперматогенеза (%)	3,67 (3,64; 3,69)	3,72 (3,71; 3,75)	0,008

Снижение индекса сперматогенеза у крыс опытной группы в условиях острой 3-часовой иммобилизации связано со снижением числа ИСК с 4 поколениями половых клеток (на 8,2 %; $p < 0,01$) и увеличением числа ИСК с 3-мя поколениями половых клеток (на 26,9 %; $p < 0,01$) в сравнении с группой контроля. Эти изменения могут быть обусловлены замедлением (частичным блокированием) процессов дифференцировки половых клеток в направлении сперматиды — сперматозоиды [7].

Известно, что КЛ являются основными интерстициальными эндокриноцитами семенников, продуцирующими тестостерон, недостаток которого приводит к снижению мейотического деления сперматоцитов и нарушению их превращения в сперматиды [18].

При обзорной микроскопии гистологических препаратов семенников крыс КЛ чаще визуализировались в интерстиции органа в виде скоплений и реже — как отдельно лежащие клетки. Они имели разнообразную форму, достаточно крупные размеры, оксифильно окрашенную цитоплазму, светлые округлые ядра с четко видимыми ядрышками и глыбчатым расположением гетерохроматина. В интерстициальной ткани семенников крыс контрольной и опытной групп присутствовали КЛ различных

морфофункциональных типов: малые, средние и большие. Согласно данным литературных источников, малые КЛ представляют собой инволюционирующие и незрелые формы эндокриноцитов, малоактивных в процессе стероидогенеза [14, 19]. КЛ среднего и большого размеров являются эндокриноцитами, активно продуцирующими стероидные гормоны [19, 20, 21].

В исследованиях О. Н. Шевантаевой и соавт. было показано, что окислительный стресс, вызванный острой гипобарической гипоксией, приводит к снижению численности клеток Лейдига через сутки после моделирования терминального состояния у животных [2].

Морфометрический анализ КЛ показал, что у животных опытной и контрольной групп относительное их количество составило 9,7 (9,4; 10,0) и 10,0 (9,9; 10,1) % соответственно, $p > 0,05$. Следовательно, кратковременный иммобилизационный стресс не оказывает влияния на относительное количество эндокриноцитов в семенниках беспородных белых крыс.

Однако нами было установлено, что у животных опытной группы в условиях острого иммобилизационного стресса происходит изменение распределения КЛ различных морфофункциональных типов. Данные о распределении КЛ по размерам представлены на рисунке 1.

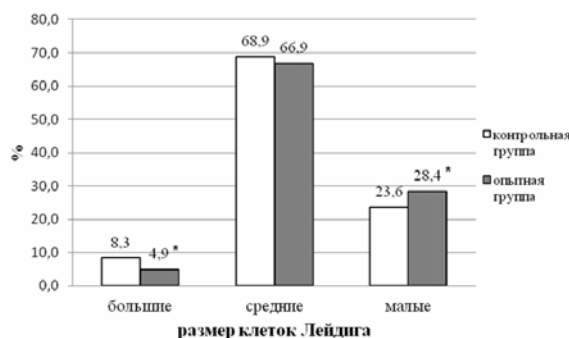


Рисунок 1 — Морфофункциональные типы клеток Лейдига у крыс опытной и контрольной группы (* значимо по сравнению с контролем, $p < 0,05$)

У крыс контрольной группы большая часть КЛ была представлена клетками средних размеров, и они составили 68,9 (65,3; 72,3) % от общего количества эндокриноцитов, что согласуется с исследованиями других авторов [1]. Большие и малые КЛ в семенниках крыс интактной группы составили, соответственно, 8,3 (6,0; 9,4) и 23,6 (19,8; 25,6) % (рисунок 1). У крыс опытной группы в популяции интерстициальных эндокриноцитов также преобладали КЛ средних размеров — 66,9 (63,9; 67,2) %. Большие и малые КЛ у животных опытной группы составили, соответственно, 4,9 (4,6; 6,0) и 28,4 (25,6; 31,3) %.

Таким образом, в результате нашего исследования было выявлено, что окислительный стресс, обусловленный однократной кратковременной иммобилизацией крыс [22], вызывает у стрессированных животных увеличение в популяции КЛ малых гормонально неактивных эндокриноцитов на 4,8 % в сравнении с группой контроля, $p = 0,007$. Увеличение количества малых КЛ происходит преимущественно за счет снижения у животных опытной группы на 3,4 % числа больших гормонально активных форм эндокриноцитов в сравнении с контрольными животными, $p = 0,03$. Количество КЛ средних размеров статистически значимо не различалось в сравниваемых группах.

В исследованиях И. Ю. Саяпиной и соавт. [1] было зарегистрировано увеличение числа малых КЛ в условиях окислительного стресса на ранних сроках (7-е сутки) адаптации крыс к низким температурам за счет снижения количества средних и больших КЛ.

Возрастание числа малоактивных КЛ и снижение количества высокоактивных КЛ в условиях однократного кратковременного иммобилизационного стресса, на наш взгляд, может являться предпосылкой к последующему угнетению стероидогенеза и, как следствие, еще большему нарушению процесса сперматогенеза в семенниках крыс.

Выводы

1. Однократное воздействие 3-часового иммобилизационного стресса вызывает нарушения процессов сперматогенеза в семенниках беспородных белых крыс, что указывает на высокую чувствительность сперматогенного эпителия к действию иммобилизационного стресса даже в условиях однократной кратковременной иммобилизации животных.

2. Однократное воздействие 3-часового иммобилизационного стресса не вызывает изменений относительного количества КЛ у беспородных белых крыс, приходящихся на поперечный срез одного извитого семенного канальца.

3. Однократное воздействие 3-часового иммобилизационного стресса приводит к возрастанию в интерстиции семенников крыс количества малоактивных форм КЛ за счет снижения высокоактивных гормонпродуцирующих эндокриноцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Саяпина, И. Ю. Репродуктивная функция семенников крыс после семидневной адаптации к низким температурам по данным морфологического анализа / И. Ю. Саяпина, Т. Л. Огородникова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. — Краснодар: КубГАУ, 2013. — № 05(89). — IDA[article ID]: 0891304030. — Режим доступа: <http://ej.kubargo.ru/2013/05/pdf/24.Pdf>.
2. Шевантаева, О. Н. Роль окислительного стресса в патогенезе нарушений сперматогенеза в постреанимационном периоде / О. Н. Шевантаева, К. Н. Конторщикова, Ю. И. Косюга // Современные технологии в медицине. — 2011. — № 3. — С. 27–30.
3. Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells / K. H. Kim [et al.] // Fertility and Sterility. — 2005. — Vol. 83, № 4. — P. 1093–1099.
4. Studies of the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) — induced oxidative damage in Leydig cells / P. Murugesan [et al.] // Free Radical Research. — 2005. — Vol. 39, № 11. — P. 1259–1272.
5. Protection of cyclophosphamid-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress / M. A. Rezvanfar [et al.] // Human & Experimental Toxicology. — 2008. — Vol. 27, № 12. — P. 901–910.
6. Stimulating effects of quercetine on sperm quality and reproductive organs in adult male rats / L. Taepogsorat [et al.] // Asian Journal of Andrology. — 2008. — Vol. 10, № 2. — P. 249–258.
7. Структурно-функциональные нарушения в семенниках крыс в условиях острого иммобилизационного стресса / Ю. Н. Королев [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. — 2012. — Т. 4. — С. 25–28.
8. Effects of immobilization stress on testicular germ cells apoptosis in rats / H. Yazawa [et al.] // Human Reproduction. — 1999. — Vol. 14, № 7. — P. 1806–1810.
9. Aziz, M. N. Effect of acute immobilization stress with or without a heme oxygenase inducer on testicular structure and function in male albino rats / M. N. Aziz, M. M. Ragy, M. F. Gayyed // J Basic Clin Physiol Pharmacol. — 2013. — Vol. 69, № 1. — P. 255–262.
10. Богомолова, Н. В. Функциональная морфология клеток крови в условиях острого иммобилизационного стресса при облучении электромагнитными волнами миллиметрового диапазона / Н. В. Богомолова, В. Ф. Киричук, С. И. Киреев // Современные наукоемкие технологии. — 2006. — № 6. — С. 43–44.
11. Хельсинская декларация всемирной медицинской ассоциации: этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследования (Сеул, 2008) // Морфология. — 2010. — № 2, Т. 4. — С. 69–72.
12. Никитин, Н. А. Анатомические особенности венозного оттока от репродуктивных органов крыс / Н. А. Никитин, А. В. Никитина, А. В. Байтингер // Бюллетень сибирской медицины. — 2012. — № 2. — С. 84–92.
13. 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.
14. Ухов, Ю. И. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников / Ю. И. Ухов, А. Ф. Астраханцев // Арх. анат. гистол. и эмбриол. — 1983. — Т. 84, № 3. — С. 66–72.
15. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера, 2003. — 312 с.
16. Потемина, Т. Е. Нарушение сперматогенеза в условиях стресса у самцов крыс / Т. Е. Потемина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2008. — Т. 145, № 6. — С. 645–647.
17. Tash, J. S. Long-term (6-wk) hindlimb suspension inhibits spermatogenesis in adult male rats / J. S. Tash, D. C. Johnson, G. C. Enders // Journal of Applied Physiology. — 2002. — Vol. 92, № 3. — P. 1191–1198.
18. Cheng, C. Y. The biology of spermatogenesis: the past, present and future / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. — 2010. — Vol. 365 (1546). — P. 1459–1463.
19. Брюхин, Г. В. Характеристика инкреторной функции семенников потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различного генеза / Г. В. Брюхин, М. Л. Сизоненко, А. С. Романов // Вопросы морфологии XXI в. Вып. 2: сб. науч. тр. — СПб.: Деан, 2010. — С. 70–75.
20. Bergh, A. Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules / A. Bergh // Int. J. Androl. — 1982. — Vol. 5, № 3. — P. 325–330.
21. Mori, H. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis / H. Mori, A. K. Christensen // J. Cell Biol. — 1980. — Vol. 84, № 2. — P. 340–354.
22. Стресс-индуцированные изменения антиоксидантного статуса сперматозоидов и морфологии семенников крыс / К. А. Кидун [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. — 2014. — № 2(40). — С. 119–125.