

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. Курьшева, Н. И. Глаукомная оптическая нейропатия / Н. И. Курьшева. — 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;

$\alpha$  — 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 генераций 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 генерациями половых клеток (%) | 67,0 (63,5; 69,5) | 73,0 (72,0; 75,0)  | 0,002 |
| Канальцы с 3 генерациями половых клеток (%) | 33,0 (29,5; 36,5) | 26,0 (24,0; 29,0)  | 0,008 |
| Канальцы с 2 генерациями 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 генерациями половых клеток (на 8,2 %;  $p < 0,01$ ) и увеличением числа ИСК с 3-мя генерациями 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.

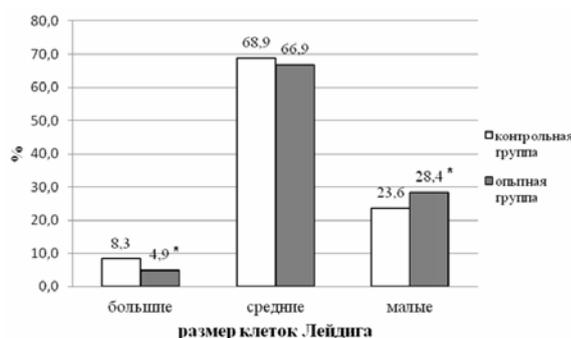


Рисунок 1 — Морфофункциональные типы клеток Лейдига у крыс опытной и контрольной группы (\* значимо по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ )

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. Rezvanzar [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.