

11. FAOSTAT[Электронный ресурс] / Food and agriculture organization of the United Nations. — Электрон. дан. — Режим доступа: <http://faostat.fao.org/de-fault.aspx?alias=faostatclassic>, свободный. — Загл. с экрана.

12. Музыка, С. М. Метеорологические закономерности биологической продуктивности макромицетов / С. М. Музыка // Макромицеты бореальной зоны: всероссийская науч.-практ. конф.:

11–13 марта 2009 года / Сиб. гос. технол. ун-т. — Красноярск: СибГТУ, 2009. — С. 2–5.

13. Зарубина, Н.Е. Влияние количества атмосферных осадков и температуры воздуха на накопление ^{137}Cs высшими грибами / Н. Е. Зарубина // Ядерная физика та энергетика. — 2012. — Т. 13, № 4. — С. 408–412.

Поступила 12.05.2014

УДК 616-092.18:577.127.4:591.463.1/2

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА СПЕРМАТОЗОИДОВ И МОРФОЛОГИИ СЕМЕННИКОВ КРЫС

К. А. Кидун, Е. К. Солодова, Т. С. Угольник, Р. В. Дорошенко

Гомельский государственный медицинский университет

Имобилизационный стресс оказывает одновременно физический и психоэмоциональный эффект на животных. Многими авторами отмечено негативное влияние данного вида стресса на состояние мужской репродуктивной системы. В настоящей работе показано негативное влияние кратковременной иммобилизации (3 часа) на состояние антиоксидантного статуса сперматозоидов и морфологии семенников крыс. Исследование проведено на 24 половозрелых самцах беспородных белых крыс. У крыс опытной группы ($n = 11$) было выявлено снижение антиоксидантного статуса сперматозоидов. У животных, перенесших иммобилизационный стресс, отмечались морфологические изменения в семенниках: снижение диаметра извитых семенных канальцев и толщины герминативного слоя, а также нарушение мейотического деления развивающихся половых клеток.

Ключевые слова: крысы, иммобилизационный стресс, семенники, извитые семенные канальцы, антиоксидантный статус, окислительный стресс морфология.

STRESS-INDUCED CHANGES OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SPERM AND MORPHOLOGY OF TESTIS

K. A. Kidun, E. K. Solodova, T. S. Ugolnik, R. V. Doroshenko

Gomel State Medical University

Immobilization stress has physical and psycho-emotional effect on animals. Numerous authors noted the negative impact of this type of stress on the state of the male reproductive system. The present work shows the negative impact of short-term immobilization (3 hours) on the state of the sperm antioxidant status and the morphology of rats testis. The study was conducted on 24 sexually mature male outbred albino rats. The rats of the experimental group ($n = 11$) showed a reduction in the antioxidant status of the sperm. The animals exposed to immobilization stress observed morphological changes in the testis: reduced diameter of seminiferous tubules and thickness of the germinal layer, as well as violation of meiotic division in developing germ cells.

Key words: rats, immobilization stress, testis, seminiferous tubules, antioxidant status, oxidative stress, morphology.

Введение

Стресс является неспецифическим общим ответом организма на действие различных повреждающих факторов, угрожающих гомеостазу [1, 18]. Согласно работам Г. Селье, при стрессе происходит активация систем нейро-гуморальной регуляции под влиянием так называемого «первичного медиатора» [1]. По современным представлениям, его роль выполняют свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов. Соответственно изменение редокс-баланса запускает комплекс защитно-приспособительных реакций, а также может негативно сказываться на морфологические характеристики органов и тканей, вызывая окислительный стресс [2].

В последние годы появляется все больше научных данных о влиянии различных экспериментальных видов стресса на репродуктивную систему животных [3–7]. Изучено негативное влияние подострого и хронического стрессов, опосредованно действующих через развитие окислительного стресса на состояние семенников у крыс и мышей [7, 8]. Однако изменения в органах мужской репродуктивной системы животных в результате более кратковременной иммобилизации изучены недостаточно полно.

Цель работы

Изучить состояние антиоксидантного статуса сперматозоидов и морфологические изме-

нения 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 250,0 г (230,0; 265,0), 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, не имевших статистически значимых различий по весу. Животных опытной группы ($n = 11$) 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 часа [9]. Интактные крысы составили группу контроля ($n=13$). 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 Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция — октябрь 2008 г.) [10].

В конце эксперимента животных обеих групп взвешивали, затем декапитировали. После декапитации у животных производили забор крови, выделяли семенники с их придатками, органы взвешивали и оценивали их массу с точностью до 1 мг. Придатки яичка разрезали продольно и из хвостовой части извлекали сперматозоиды, дозированным вымыванием дистиллированной водой в течение 2 мин. Смыть спермы центрифугировали при 1800 оборотах в минуту в течение 10 минут на центрифуге MPW 210 (Польша). Собирали осадочную часть лизированных сперматозоидов. Лизис сперматозоидов контролировали с использованием микроскопии.

В лизате сперматозоидов определяли антиоксидантный статус (АОС) по методу Т. В. Сироты (патент № 2144674, Россия, 2000 г.) в модификации А. И. Грицука с соавт. на кафедре биологической химии Гомельского государственного медицинского университета [11]. В ходе превращения адреналина через адреналинхинон в адренохром возникают супероксидные радикалы, инициирующие аутоокисление адреналина в щелочной среде. Антиоксидантная система, перехватывая супероксидные радикалы, ингибирует образование адренохрома. Способность биологических жидкостей (лизата сперматозоидов) ингибировать реак-

цию аутоокисления адреналина в щелочной среде расценивали как антиоксидантную активность (+1у.е.), активировать — как прооксидантную (-1у.е.).

С целью исключения влияния анатомических особенностей кровоснабжения на результат исследования для оценки морфологических 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 Nikon Eclipse 50i (Япония) при общем увеличении $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$. Срезы фотографировали с помощью фотокамеры DS-F1.

Оценивали количество извитых семенных (ИСК) канальцев в 10 полях зрения, используя увеличение 10×10 . Площадь полей зрения при увеличении 10×10 составила $1200,9 \times 990,2 = 1189179,2$ мкм². Измеряли диаметр поперечно срезаемых ИСК и толщину герминативного слоя в мкм [14].

Для оценки состояния сперматогенеза подсчитывали число ИСК с 12-й стадией мейоза в 100 поперечно срезаемых ИСК (увеличение 10×40) [14, 15].

Среднее количество клеток Сертоли в ИСК рассчитывали в 20 поперечно срезаемых ИСК (увеличение 10×40) [14].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica», 8.0. В связи с тем, что большинство изучаемых признаков не подчинялись закону нормального распределения (тест Шапиро – Уилки, W), для сравнения показателей в двух независимых группах применяли непараметрический критерий Манна – Уитни (U). Данные в тексте и таблице приведены в виде Me (Q_1 ; Q_3), где Me — медиана, Q_1 ; Q_3 — верхний и нижний квартиль. Различия между показателями считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$ [16].

Результаты и обсуждения

Окислительный стресс является результатом дисбаланса между активностью антиоксидантных систем организма и количеством продуцируемых активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) [1, 17, 18]. Определение антиоксидантного статуса биологических жидкостей

позволяет оценить состояние баланса между про- и антиоксидантной системами.

У животных, перенесших острый иммобилизационный стресс, отмечалось статистически значимое снижение АОС сперматозоидов — 10,5 (-2,6;

28,3) у.е. по сравнению с интактными животными — 23,9 (19,6; 36,8) у.е. ($p = 0,023$). У 36,4 % крыс опытной группы наблюдалась прооксидантная активность сперматозоидов, что свидетельствует о развитии у них окислительного стресса (рисунок 1).



Рисунок 1 — Антиоксидантный статус сперматозоидов у животных опытной и контрольной группы

Иммобилизационный стресс является смешанным видом стресса, оказывающим как физический, так и психоэмоциональный эффект [19, 20]. Данный вид стресса реализует свое влияние через изменение нейро-гуморальных механизмов регуляции, обуславливая снижение продукции мужских половых гормонов. Также он вызывает активацию NO-синтаз, что, в свою очередь, обуславливает образование АФА [5]. Показано, что избыток АФК и АФА оказывает неодинаковый эффект на суспендоциты и клетки сперматогенного эпителия на разных стадиях развития [15, 17]. На ранних стадиях сперматогенеза окислительный стресс может приводить к нарушению процесса деления клеток и вызывать «мейотический арест», а в зрелых сперматозоидах может оказывать повреждающее действие на митохондриальный геном с последующей недостаточностью клеточного дыхания [4, 17].

При макроскопическом исследовании у крыс опытной группы семенники были отечные, рыхлой консистенции, имели насыщенно красный цвет, на поверхности определялись полнокровные кровеносные сосуды. Вес семенников у животных опытной и контрольной групп статистически значимых различий не имел.

Микроскопическое исследование семенников показало, что количество ИСК у крыс опытной группы не имело статистически значимых отличий по сравнению с животными контрольной группы и составило, соответственно, 122,0 (101,0; 126,0) и 121,0 (112,0; 131,0) ($p > 0,05$).

Известно, что важным количественным показателем, указывающим на угнетение сперматогенеза в семенниках крыс, является

диаметр ИСК [21]. Уменьшение диаметра канальцев семенников при действии экстремальных факторов на организм животных отмечается многими авторами. В исследованиях J. S. Tash с соавт. было выявлено снижение диаметра ИСК в семенниках крыс при гипокинетическом стрессе [22].

При проведении морфометрического анализа семенников крыс также было выявлено статистически значимое снижение диаметра ИСК у животных, подвергнутых 3-часовому иммобилизационному стрессу — 243,1 (225,8; 252,7) мкм против 283,8 (270,5; 300,7) мкм в контрольной группе ($p < 0,0001$).

Известно, что диаметр ИСК находится в тесной взаимосвязи с количеством клеток в составе эпителиосперматогенного пласта [19]. Уменьшение данного морфометрического показателя сопровождается уменьшением числа сперматогенных клеток в просвете канальца [23]. Полученные нами результаты показали, что снижение диаметра ИСК сопровождается статистически значимым снижением толщины герминативного слоя ИСК в опытной группе животных — 61,8 (57,5; 65,8) мкм против 93,7 (91,4; 95,6) мкм в группе контроля ($p < 0,0001$).

Редукция количества клеток сперматогенеза, сопровождающаяся снижением толщины герминативного слоя ИСК, может быть связана с нарушениями как кариокинетического, так и мейотического деления половых клеток в результате окислительного стресса. О нарушениях процессов мейотического деления половых клеток в нашем исследовании свидетельствует статистически значимое увеличение количества ИСК с 12-й фазой мейоза в семенниках крыс опытной группы (таблица 1).

Таблица 1 — Количество клеток Сертоли и ИСК с 12-й фазой мейоза в семенниках крыс опытной и контрольной групп

Параметры	Опытная группа, n = 11	Контрольная группа, n = 13	p
ИСК с 12-й фазой мейоза	6,0 (6,0; 8,0)	3,0 (1,0; 5,0)	< 0,001
Клетки Сертоли	21,2 (18,7; 21,8)	21,3 (20, 1;22,2)	0,297

Увеличение количества ИСК с 12-й фазой мейоза у животных, подвергнутых иммобилизационному стрессу, может указывать на «мейотический арест» [15]. Это может быть обусловлено окислительным стрессом, сопровождающимся нарушением митохондриальной дыхательной активности в развивающихся половых клетках [17].

Показано, что уменьшение диаметра ИСК обусловлено не только редукцией количества герминативных клеток в составе эпителиосперматогенного пласта, но и уменьшением секреции жидкой среды канальца клетками Сертоли [24]. В исследованиях О. Н. Шевантаевой и соавт. было показано, что окислительный стресс, вызванный острой гипобарической гипоксией, приводит к снижению количества клеток Сертоли лишь на 3-и сутки после моделирования терминального состояния у животных [18].

Проведенные нами исследования показали, что кратковременный иммобилизационный стресс не оказывает влияния на количество клеток Сертоли и оно статистически значимо не отличается от контрольных значений. Однако действие иммобилизационного стресса приводит к изменениям морфологических характеристик клеток Сертоли. Так, в семенниках животных опытной группы большинство клеток Сертоли были разобщены и располагались изолированно друг от друга. Многие из них утратили большую часть своей цитоплазмы, которая отторгалась в просвет ИСК. Некоторые клетки Сертоли приобретали уплощенную форму с уплощенными иногда гиперхромными ядрами. Цитоплазма большинства клеток Сертоли имела пенистый, ячеистый характер.

Подобного рода морфологические изменения клеток Сертоли могут быть связаны с явлениями внеклеточного и внутриклеточного отека в сперматогенном эпителии, наблюдаемого в семенниках крыс в условиях однократного иммобилизационного стресса [4].

Данные морфологические изменения в семенниках негативно сказываются на репродуктивной способности животных и могут являться предпосылкой развития нарушений процесса сперматогенеза у мужчин в условиях окислительного стресса.

Выводы

1. Острый 3-часовой иммобилизационный стресс приводит к снижению антиоксидантно-

го статуса сперматозоидов у самцов беспородных белых крыс.

2. Морфологические изменения семенников у крыс в условиях острого иммобилизационного стресса сопровождаются нарушением микроциркуляции, развитием отека, дистрофических изменений в эпителии извитых семенных канальцев.

3. У самцов крыс, перенесших острый 3-часовой иммобилизационный стресс, выявлено снижение диаметра ИСК и толщины герминативного слоя с нарушением мейотического деления развивающихся половых клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Кузьменко, Е. В. Современные представления о проявлениях механизмов психоэмоционального стресса / Е. В. Кузьменко // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». — 2013. — № 2, Т. 26 (65). — С. 95–106.
- Резников, А. Г. Эндокринологические аспекты стресса / А. Г. Резников // Международный эндокринологический журнал. — 2007. — № 4(10). — С. 11–17.
- Study of Spermatogenesis Fetal Testis Exposed Noise Stress During and after Natal Period in Rat / M. Jalali [et al.] // Pakistan Journal of Biological Sciences. — 2013. — Vol. 16. — P.1010–1015.
- Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats / H. Yazawa [et al.] // Human Reproduction. — 1999. — № 7, Vol. 14. — P. 1806–1810.
- Tavakoli, P. Restraint Stress is Biomedically Important in Male Reproductive Failure / P. Tavakoli, R. Ahmadi, M. Mafi // ICCBMS. — 2012. — P. 17–19
- Структурно-функциональные нарушения в семенниках крыс в условиях острого иммобилизационного стресса / Ю. Н. Королев [et al.] // Андрология и генитальная хирургия. — 2012. — № 4. — С. 25–28.
- Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat / M. Nirupama [et al.] // J Physiol Biochem. — 2013. — № 1, Vol. 69. — P.59–68
- Aziz, N. M. Effect of acute immobilization stress with or without a heme oxygenase inducer on testicular structure and function in male albino rats / N. M. Aziz, M. M. Ragy, M. F. Gayyed // J Basic Clin Physiol Pharmacol. — 2013. — № 4, Vol. 24. — P. 255–262
- 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.
- Хельсинкская 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.
- Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости / А. И. Гришук [и др.] // Биомедицинская химия. — 2006. — Т. 52, Вып. 6. — С. 601–607.
- 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.
- Пешков, М. В. Метод гистологической проводки тканью с использованием изопропанола и минерального масла / М. В. Пешков, И.И. Дыгало // Архив патологии. — 2009. — № 3. — С. 39–41.

14. Ухов, Ю. И. Мофометрические 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. Саноцкий, И. В. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм / И. В. Саноцкий, В. Н. Фоменко. — М.: Медицина, 1979. — 230 с.
16. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера. 2003. — 312 с.
17. Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents / J. Odum [et al.] // ENV/JM/MONO. — Paris, 2009. — № 106, Vol. 11. — P. 26.
18. 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.
19. Deranged Spermatogenesis of Adult Swiss Albino Mice as Effect of Immobilization Stress - Histological Study / B. Khandve [et al.] // Isr Journal Of Pharmacy. — 2013. — № 2, Vol. 3 — P. 7–10.
20. Animal models of anxiety disorders and stress / A. C. Campos [et al.] // Rev. Bras. Psiquiatr. — 2013. — № 2, Vol. 3 5. — P. 101–111.
21. 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>
22. Tash, J. S. Long-term (6-wk) hind limb suspension inhibits spermatogenesis in adult male rats / J. S. Tash, D. C. Johnson, G. C. Enders // Journal of Applied Physiology. — 2002. — №3, Vol. 92. — P. 1191–1198.
23. Creasy D. M. Pathogenesis of male reproductive toxicity / D. M. Creasy // Toxicologic Pathology. — 2001. — № 1, Vol. 29. — P. 64–76.
24. Курило, Л. Ф. Роль структурных хромосомных аномалий в развитии патозооспермии у мужчин с бесплодием / Л. Ф. Курило, Е. М. Гришина // Андрология и генитальная хирургия. — 2006. — № 4. — С. 36–40.

Поступила 16.05.2014

УДК 611.818+611.821]:616-007.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОДОЛГОВАТОГО И СПИННОГО МОЗГА СИАМСКИХ БЛИЗНЕЦОВ

В. С. Школьников, В. А. Тихолаз, Ю. Й. Гуминский

Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина

Цель: установить особенности структуры и морфометрические параметры продолговатого и спинного мозга сиамских близнецов человека сроком гестации 18 недель внутриутробного развития.

Материалы и методы. Проведено морфогистологическое исследование продолговатого и спинного мозга сиамских близнецов женского пола (торако-омфалопаг) сроком гестации 18 недель. Измерение теменно-копчиковой длины, продольного и поперечного размеров продолговатого и спинного мозга проводилось по общепринятым методикам. Материал для исследования был получен в результате прерывания беременности по медицинским показаниям. Из материала изготавливались целлоидиновые и парафиновые блоки для выполнения серийных срезов продолговатого и спинного мозга. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим, по Ван-Гизон, а также применялась импрегнация серебром по Бильшовскому. Полученные препараты оценивали визуально при помощи микроскопа Micromed XS 5520, видеозахват осуществляли камерой ScienceLab DCM 520. Статистическая обработка цифровых данных производилась с помощью стандартного программного пакета «Statistica», 8.0 фирмы Statsoft.

Результаты. В работе представлены результаты анатомического и гистологического исследования продолговатого и спинного мозга торако-омфалопага плода человека 18 недель внутриутробного развития.

Заключение. Установлены особенности архитектоники и морфометрические параметры структур продолговатого и спинного мозга, а также топография и размеры ядер, степень дифференцирования составляющих их нейронов.

Ключевые слова: продолговатый мозг, спинной мозг, морфометрические параметры, сиамские близнецы.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF SPINAL CORD AND MEDULLA OBLONGATA IN SIAMESE TWINS

V. S. Shkolnikov, V. O. Tikholaz, Yu. Y. Guminskiy

National Pirogov Memorial Medical University, Ukraine

Objective: set the particular structure and morphometric parameters of medulla oblongata and spinal cord in Siamese twins with 18-week gestation of the intrauterine development.

Material and methods. The morphological study was conducted on oblongata and spinal cord of female conjoined twins (thoraco-omfalopag) with the gestational age of 18 weeks. The measurement of the parietal-coccygeal length of the longitudinal and transverse dimensions of the medulla oblongata and the spinal cord was performed by conventional methods. The material for the study was obtained as a result of abortion for medical reasons. From the material paraffin blocks were made for performing serial sections of the spinal cord and medulla. The slides were stained with hematoxylin-eosin, toluidine blue, Van-Gieson, and silver impregnation by Bilshovski. The resultant preparations were visually evaluated under the microscope Micromed XS 5520, video capture camera performed ScienceLab DCM 520. Statistical processing of digital data using a standard software package «Statistica 8.0» by Statsoft company.

Results. The work presents the results of anatomical and histological examination of the medulla oblongata and spinal cord of the thoraco-omfalopaga human fetus of 18 weeks of fetal development.