

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.379-008.64-02:612.616]-053.31]-092.9

Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Характеристика клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 454092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

Цель исследования – анализ содержания и субпопуляционного состава клеток Лейдига у потомства самок крыс «Вистар» экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в период новорожденности.

Методика. Исследования выполнены на белых крысах – самках «Вистар» и их потомстве в возрасте 1 сут. У взрослых половозрелых самок моделировали стрептозотоциновый сахарный диабет 1 типа. Изучены морфофункциональные особенности эндокринных клеток семенников у потомства самок крыс с экспериментальным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период.

Определяли площадь интерстициальной соединительной ткани семенников, число активных и неактивных эндокриноцитов, вычисляли индекс активности клеток Лейдига, рассчитывали коэффициент, отражающий отношение числа клеток Лейдига к суммарному содержанию сперматогенных клеток, а также коэффициент, отражающий отношение суммарного количества интерстициальных glanduloцитов к содержанию sustentocитов.

Результаты. Показано, что у подопытных крысят снижена абсолютная масса семенника и его весовой индекс, увеличена площадь стромы, изменено количество клеток Лейдига и их субпопуляционный состав и, как следствие, изменен индекс активности этих клеток. Выявлено существенное снижение у подопытных животных отношения числа клеток Лейдига к содержанию клеток Сертоли, между которыми существуют определенные паракрынные взаимоотношения.

Заключение. Выявленные изменения могут являться одной из возможных причин нарушения сперматогенного цикла у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, потомство, семенники, клетки Лейдига, крысы.

Для цитирования: Брюхин Г.В., Антонов С.Д. Характеристика клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в ранний неонатальный период. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 105-109.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.105-109

Для корреспонденции: Антонов Сергей Дмитриевич, e-mail: s.d.antonov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.06.2019

Bryukhin G.V., Antonov S.D.

Characteristic of leydig cells from newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes

South-Ural State Medical University,
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

Numerous clinical observations have shown that maternal diabetes adversely affects pregnancy and childbirth as well as the development and condition of the fetus. These women often give birth to children with signs of diabetic fetopathy. However, the effect of type 1 diabetes mellitus on morphology and function of the male offspring reproductive system is still understudied.

The aim of the study was evaluating morpho-functional characteristics of Leydig cells in newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes.

Methods. Experiments were performed on Wistar female rats and their one-day offspring. Type 1 diabetes mellitus was modelled in adult, sexually mature females using streptozotocin. Morpho-functional features of testicular endocrine cells were studied in the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes in the early neonatal period. The following indexes were determined: area of testicular interstitial tissue; number of active and inactive endocrinocytes; Leydig cell activity index; the ratio of Leydig cells number to the total number of spermatogenic cells; and the ratio of total number of interstitial glandulocytes to the number of sustentocytes.

Results. The offspring of experimental rats had a decreased absolute testis weight and testis weight index; an increased area of interstitial tissue; changes in the count of Leydig cells and their subpopulation composition and resultant changes in the Leydig

cell activity index. The ratio of Leydig cell number to Sertoli cell number, which are characterized with paracrine interrelations, was decreased.

Conclusion. The found changes may underlie disorders of the spermatogenic cycle in the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes.

Keywords: diabetes; offspring; testes; Leydig cells; rats.

For citation: Bryukhin G.V., Antonov S.D. Characteristic of Leydig cells from newborn offspring of female rats with experimental type 1 diabetes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4):105-109. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.105-109

For correspondence: *Sergei D. Antonov*, aspirant of the Department of Histology, Cytology and Embriology Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "South-Ural State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 64 Vorovskogo Str., Chelyabinsk 454092, e-mail: s.d.antonov@mail.ru

Information about authors:

Bryukhin G.V., <https://orcid.org/0000-0002-3898-766X>

Antonov S.D., <https://orcid.org/0000-0002-3166-5270>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 12.06.2019

Введение

В настоящее время отмечается рост заболеваемости сахарным диабетом, в том числе среди женщин фертильного возраста [1]. Многочисленные клинические наблюдения подтверждают тот факт, что сахарный диабет матери оказывает неблагоприятное влияние на течение беременности и родов, а также на развитие и состояние плода. У женщин с диабетом часто рождаются дети с признаками диабетической фетопатии. Диабетологи считают, что гипергликемия уже на ранних стадиях беременности обуславливает нарушение формирования органов плода: в 5 раз чаще рождаются дети с пороками сердца, нередко с поражениями почек, мозга и кишечными аномалиями. Кроме того у таких женщин чаще отмечается перинатальная гибель плода [2, 3]. На сегодняшний день недостаточно изучено влияние сахарного диабета 1 типа матери на морфофункциональное становление мужской репродуктивной системы потомства.

Цель исследования – анализ содержания и субпопуляционного состава клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в период новорожденности.

Методика

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986. Эвтаназия животных проводилась методом декапитации под эфирным наркозом. Работа одобрена этическим локальным комитетом.

Исследования проведены на белых лабораторных крысах самках «Вистар» и их потомстве в ранний неонатальный период. У взрослых половозрелых самок воспроизводили стрептозотоциновый сахарный диабет 1 типа [4]. Препарат вводили до беременности трижды с интервалом 7 сут по 20-25 мг/кг массы. За весь курс животные получали по 17 мг стрептозотацина. О развитие сахарного диабета свидетельствовал повышенный уровень содержания глюкозы в крови ($32,56 \pm 2,44$ ммоль/л), сохранявшийся длительное время (более 3 мес). Через 1 нед после последней инъекции самок подсаживали к интактным самцам.

Объектом исследования было потомство самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа в 1-е сут постнатальной жизни. Эту группу составили 12 крысят из 12 пометов, а группу сравнения (контрольная группа) составили 10 новорожденных крысят из 8 пометов. Проводили определение абсолютной и относительной (весовой индекс) массы семенников. На серийных гистологических срезах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи морфометрической установки МОТИС ВА 400 (Германия) проводили определение площади паренхимы и интерстициальной ткани семенников, производили подсчет суммарного содержания эндокриноцитов, среди которых определяли число активных и неактивных клеток [5]. Клетки Лейдига подсчитывали в 30 полях зрения из расчёта на условную единицу площади (593300 мкм²). Индекс активности клеток Лейдига определяли как отношение суммарного числа активных клеток к неактивным, подсчитанных в 30 полях

зрения [6]. Расчитывали коэффициент (K_1), отражающий отношение числа клеток Лейдига к суммарному содержанию сперматогенных клеток из расчета на один семенной извитой каналец. Кроме того определял коэффициент (K_2), отражающий отношение суммарного количества интерстициальных гландулоцитов к числу sustentocитов [5, 7].

Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica v.6 (Stasoft, Inc.) и представлены в виде медианы с интерквартильным размахом. Учитывая небольшую выборку животных, значимость результатов определяли непараметрическим методом Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у подопытных крысят статистически значимо снижалась абсолютная масса семенника (г) и его весового индекса (%) (соответственно 0,004 [0,003–0,005] и 0,052 [0,045–0,055]) по сравнению с контролем (соответственно 0,0065 [0,006–0,008] г и 0,1 [0,09–0,12]). Различия в массе правого и левого семенника отсутствовали. У подопытных животных имело место увеличение площади интерстициальной ткани семенников – 15454 [15147–19120] μm^2 по сравнению с группой контроля 14695 [13382–15240] μm^2 . При этом площадь паренхимы семенника оказалась сниженной 20066 [16400–20373] μm^2 по сравнению с интактной группой 20825 [20280–22138] μm^2 , что обусловило и снижение коэффициента, отражающего отношение площади паренхимы к площади стромы 1,3 [0,86–1,35] по сравнению с контролем 1,42 [1,33–1,65]. Анализ суммарного содержания клеток Лейдига в семеннике подопытных крысят не выявил статистически значимого снижения исследуемого показателя (таблица).

Наибольший интерес представляет цитологический анализ эндокриноцитов. Как видно из таблицы,

у подопытных животных имеет место изменение субпопуляционного состава эндокриноцитов: снижение содержания активных клеток Лейдига при увеличении числа неактивных клеток, что обусловило снижение индекса активности клеток Лейдига. Увеличивался коэффициент (K_1), отражающий отношение суммарного содержания клеток Лейдига к общему числу сперматогенных клеток из расчета на один семенной извитой каналец.

Учитывая, что между эндокриноцитами и sustentocитами существуют выраженные паракринные взаимоотношения [8, 9], особый интерес представляет коэффициент, отражающий отношение суммарного количества клеток Лейдига к числу клеток Сертоли из расчета на один семенной извитой каналец (K_2). Прежде всего, необходимо отметить, что содержание клеток Сертоли в семенниках крысят обеих экспериментальных групп практически не отличалось и у подопытных животных составило 4,2 [3,7–4,4], а в группе сравнения 4,1 [4,0–4,2] на один извитой семенной каналец. Как видно из таблицы, исследуемый коэффициент у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа оказался существенно сниженным по сравнению с группой контроля.

Таким образом, у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа имеет место снижение в семенниках содержания эндокриноцитов, продуцирующих тестостерон, необходимый для нормального сперматогенеза. Эти данные согласуются с результатами, указывающими на снижение фракции активных клеток Лейдига за счет увеличения числа неактивных эндокриноцитов. Обращает на себя внимание и существенное снижение у подопытных животных коэффициента, отражающего отношение суммарного содержания клеток Лейдига к числу клеток Сертоли, между которыми существуют выраженные паракринные взаимоотношения [10]. Исходя из выше-

Таблица

Характеристика клеток Лейдига экспериментальных животных, Me [Q₁ – Q₃].

Экспериментальная группа	Сперматогенные клетки	Клетки Лейдига	Активные клетки Лейдига	Неактивные клетки Лейдига	Индекс активности	K1	K2
Контроль	10,1 [9,9 – 11,7]	34,3 [33,8 – 36,7]	11,4 [10,0 – 12,1]	23,87 [23,7 – 23,9]	0,49 [0,42 – 0,5]	3,42 [2,93 – 3,72]	8,36 [8,15 – 9,0]
			33,1 [29,4 – 33,3] %	67,0 [66,7 – 70,6] %			
Опыт	7,7 [7,2 – 8,1]*	34,0 [32,3 – 34,3]	8,9 [7,4 – 9,3]*	25,0 [24,9 – 25,2]*	0,35 [0,3 – 0,37]*	4,44 [4,0 – 4,49]*	7,97 [7,84 – 8,62]*
			26,0 [23,0 – 27,2] %*	74,0 [72,8 – 77,0] %*			

Примечание. * – результаты статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$).

изложенного, можно предположить, что выявленные нарушения соотношения между клетками Лейдига и sustentocитами в перспективе могут стать одной из возможных причин изменения сперматогенного цикла у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Логично предположить, что выявленные изменения морфофункционального состояния клеток Лейдига семенников потомства самок крыс первоначально обусловлены, прежде всего, гипергликемией, которой отводится иницирующая роль в развитии осложнений сахарного диабета. Согласно данной литературы, при гипергликемии матери, глюкоза в избытке попадает через плаценту в кровь плода [11], вызывает гиперплазию бета-клеток островков Лангерганса. Развивающийся гиперинсулинизм плода, в конечном итоге, приводит к развитию гипогликемии, являющейся одним из наиболее серьезных осложнений антенатального периода. Кроме того, известно, что сахарный диабет сопровождается накоплением в организме матери кетоновых тел, которые свободно проходят через плацентарный барьер. Можно предположить, что именно гипогликемия и гиперкетонемия нарушают условия антенатального развития и могут явиться основными патогенетическими факторами нарушения процессов гистогенеза, в том числе пролиферации и дифференцировки тканевых элементов семенников у потомства.

Заключение

Полученные результаты научно обосновывают вероятность нарушения мужской репродуктивной функции у потомства матерей с сахарным диабетом. В связи с этим представляется чрезвычайно перспективным проведение дальнейших исследований особенностей морфофункционального становления генеративной и эндокринной функции яичек у потомства от матерей с сахарным диабетом в условиях клиники и эксперимента. Эти данные могут быть использованы при разработке мер профилактики и оптимизации методов лечения дисфункции мужской репродуктивной системы пациентов.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Брюхин Г.В.

Сбор и обработка материала — Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Статистическая обработка — Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Написание текста — Брюхин Г.В., Антонов С.Д.

Редактирование — Брюхин Г.В.

Литература

1. Кожевникова С.А., Будневский А.В., Овсянников Е.С., Малыш Е.Ю., Белов В.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких и сахарный диабет: взгляд на эпидемиологию, патогенетические механизмы, лечение. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 4: 122-7.
2. Питер-Хармел Э., Матур Р. *Сахарный диабет: диагностика и лечение*. М.; Практика; 2008.
3. Шестакова М.В., Северина А.С., Дедов И.И. *Гипергликемия как фактор риска сосудистых осложнений диабета. В кн.: Сахарный диабет: острые и хронические осложнения*. М.; ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011: 59-81.
4. Закирьянов А.Р., Плахотный М.А., Онищенко Н.А., Володина А.В., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П. и др. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2007; 4: 21-5.
5. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1983; 3: 66-72.
6. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Характеристика клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 1: 80-3.
7. Иванов Ю.В. Цитологические критерии состояния сперматогенеза в токсиколого-гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 1986; 4: 52-4.
8. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. *Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции)*. Оренбург; издательство ОрГМА; 2010.
9. Дедов В.И. Ультраструктура клеток Сертоли и Лейдига у крыс в норме и в условиях длительного внутреннего облучения. *Цитология*. 1980; 10: 1153-6.
10. Захидов С.Т., Маршак Т.Л. Экспериментальные доказательства пролиферации и размножения высокодифференцированных клеток Сертоли. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2015; 4: 350-60.
11. Капустин Р.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н. Патология плаценты и плода при сахарном диабете. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2018; 67 (6): 79-92.

References

1. Kozhevnikova S.A., Budnevskiy A.V., Ovsyannikov E.S., Malyshev E.Yu., Belov V.N. Chronic obstructive pulmonary disease and diabetes: a look at the epidemiology, pathogenesis mechanisms, treatment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 4: 122-7. (in Russian)
2. Piter-Kharmel E., Matur R. *Diabetes mellitus: diagnosis and treatment. [Sakharnyy diabet: diagnostika i lechenie]*. Moscow: Praktika; 2008. (in Russian)
3. Shestakova M.V., Severina A.S., Dedov I.I. *Hyperglycemia as a risk factor for vascular complications of diabetes. In.: Diabetes mellitus: acute and chronic complications. [Sakharnyy diabet: ostrye i khronicheskije oslozhneniya]*. Moscow; ООО «Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2011: 59-81. (in Russian)
4. Zakirianov A.R., Plakhotnyy M.A., Onischenko N.A., Volodina A.V., Klimenko E.D., Kobozeva L.P. et al. Diabetic complications in rats in long-term modeling of type I diabetes. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2007; 4: 21-5. (in Russian)

5. Ukhov Yu.I., Astrakhantsev A.F. Morphometric methods in assessing the functional state of the testes. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1983; 3: 66-72. (in Russian)
6. Bryukhin G.V., Sizonenko M.L. Characteristics of Leydig cells in the newborn posterity of female rats with chronic injury of the hepatobiliary system of various genesis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 1: 80-3. (in Russian)
7. Ivanov Yu.V. Cytological criteria for spermatogenesis in toxicological and hygienic studies. *Gigiena i sanitariya*. 1986; 4: 52-4. (in Russian)
8. Shevlyuk N.N., Stadnikov A.A. *Leydig cells of the testicles of vertebrates (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation)*. [Kletki Leydiga semennikov pozvonochnykh (ontogenez, ul'trastruktura, tsitofiziologiya, faktory i mekhanizmy regulyatsii)]. Orenburg: Izdatel'stvo OrGMA; 2010. (in Russian)
9. Dedov V.I. Ultrastructure of Sertoli and Leydig cells in rats under normal conditions and prolonged internal irradiation *Tsitologiya*. 1980; 10: 1153-6. (in Russian)
10. Zakhidov S.T., Marshak T.L. Experimental evidence of proliferation and reproduction of Sertoli high differentiation cells. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*. 2015; 4: 350-60. (in Russian)
11. Kapustin R.V., Onopriyuchuk A.R., Arzhanova O.N. Pathophysiology of the placenta and fetus in diabetes mellitus. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2018; 67 (6): 79-92. (in Russian)

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» Минздрава России, e-mail: bgenvas@mail.ru

Антонов Сергей Дмитриевич, соискатель каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» Минздрава России, e-mail: s.d.antonov@mail.ru