

Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л.

Характеристика клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

Проанализированы морфофункциональные особенности интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига) у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза. Установлено, что у подопытных крысят имеет место снижение числа клеток Лейдига, изменение соотношения активных и неактивных эндокриноцитов и, как следствие, уменьшение индекса активности этих клеток.

Ключевые слова: семенники, клетки Лейдига, патология печени, крысы, потомство

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

South-Ural State medical University, 64, Vorovsky str., Chelyabinsk, 454092, Russia

Morphological and functional features of interstitial endocrine cells (Leydig cells) in the posterity of female rats with experimental liver injury of various genesis in the neonatal period were analyzed. Found that in experimental rats are a reduction in the number of Leydig cells, the ratio between active and inactive endocrinocytes and as a consequence, reduction of its cell activity index.

Key words: testes, Leydig cells, liver disease, rats, posterity

Актуальность исследования обусловлена, прежде всего, увеличением числа бесплодных браков. В настоящее время репродуктологи и социологи особое внимание в структуре бесплодия супружеских пар уделяют мужскому фактору. Согласно современным представлениям, причинами нарушения мужского репродуктивного здоровья являются разнообразные факторы, среди которых особое значение уделяется особенностям пренатального развития, когда формируется репродуктивная система и происходит становление гипоталамо-гипофизарно-гонадных взаимоотношений [4—6]. К сожалению, на сегодняшний день остается до конца не изученным влияние экзогенных и эндогенных факторов на пренатальное становление мужской репродуктивной системы. В то же время для разработки эффективных методов защиты репродуктивной системы от действия факторов, угнетающих сперматогенную функцию человека, необходимо изучение тонких механизмов их повреждающего действия.

Для корреспонденции: Сизоненко Максим Леонидович, к.м.н., доцент каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, e-mail:

Цель исследования — анализ особенностей морфофункционального состояния клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Методика

Исследования проведены на белых крысах «Вистар» (самках) и их потомстве в период новорожденности. Для достижения поставленной цели у взрослых половозрелых самок моделировались поражение гепатобилиарной системы.

Алкогольную хроническую интоксикацию с преимущественным поражением печени создавали у крыс до беременности путем замены питьевой воды 15% раствором этилового спирта в течение 3 мес. в условиях свободного доступа [7]. Эту группу (алкогольная «Ал»- группа) составили 12 крысят из 12 пометов.

Мезенхимальное поражение печени у самок крыс создавали путем введения 20 ЕД активности щелочной фосфатазы [8]. Эту группу (мезенхимальная «М»- группа) составили 10 крысят из 10 пометов.

Аутоиммунное поражение печени создавали путем длительной (4 мес) сенсibilизации животных гомологичным антигеном печени с адъювантом Фрейнда по общепринятой методике. Первоначально печеночный антиген вводили подкожно с адъювантом Фрейнда, а затем внутривентриально в возрастающих дозах с интервалом 3 сут (всего 7 инъекций). Повторную иммунизацию проводили через 10—15 сут. от момента последней инъекции по сходной схеме. Всего проведено 3 цикла иммунизации. Доза печеночного антигена, получаемого животными за полный курс иммунизации, составила 200 мг гомологичного антигена. Эту группу (аутоиммунная «А»-группа) составили 10 крысят из 10 пометов.

Лекарственное поражение печени осуществляли путем интрагастрального введения животным тетрациклина в дозе 1,5 г на кг массы тела на 1% крахмальном растворе ежедневно в течение 5 сут. [9]. Эту группу (лекарственная «Л»-группа) составили 9 крысят из 9 пометов.

Поражение печени верифицировали морфологически (жировая дистрофия гепатоцитов, расширение синусоидных капилляров, дисконфлексация гепатоцитов, умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы печени), биохимически (увеличение аспаратаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы, повышение концентрации билирубина) и иммунологически (титр противопеченочных антител 1:64 и 1:128) критериев. Через 1 нед. после замены спирта водой и введения гепатотоксических соединений (D-галактозамина и щелочной фосфатазы) к крысам подсаживали интактных самцов.

Группу сравнения (контрольная «К»-группа) составили 14 крысят из 14 пометов.

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Объектом исследования явилось однодневное потомство самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы. На серийных гистологических срезах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи морфометрической установки Motic BA 400 (Германия) проводили определение площади интерстициальной ткани семенников. Кроме того, производили подсчет суммарного количества клеток Лейдига, в общей популяции которых определяли активные и неактивные гландулоциты [10]. Клетки Лейдига подлежали количественной оценке в 30 полях зрения из расчета на один строго поперечный срез извитого семенного канальца. Индекс активности интерстициальных гландулоцитов семенника подсчитывали как отношение числа активных клеток Лейдига к неактивным, подсчитанным

в общих 30 полях зрения. Кроме того, определялся коэффициент (K_1), отражающий отношение числа клеток Лейдига к суммарному содержанию сперматогенных клеток из расчета на один семенной каналец. Учитывая тесные паракринные взаимоотношения между клетками Лейдига и sustentоцитами, нами производился подсчет коэффициента (K_2), отражающего отношение суммарного количества интерстициальных эндокриноцитов к таковому клеток Сертоли.

Полученные данные обработаны на компьютере с использованием программы Statistica v.6. (Stasoft, Inc.). Учитывая небольшую выборку животных, значимость результатов оценивали непараметрическим методом — критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Прежде всего, нами установлено, что площадь интерстициальной ткани в семенниках подопытных животных большинства экспериментальных групп увеличена по сравнению с группой контроля. Так, у интактных новорожденных крысят площадь интерстициальной ткани семенников составила $39,40 \pm 0,13\%$. При этом площадь интерстиция семенников у животных «алкогольной» группы — $41,30 \pm 1,67\%$, «аутоиммунной» — $47,40 \pm 0,13\%$ и особенно «лекарственной» — $59,64 \pm 1,98\%$ групп значимо превысила таковой показатель в контроле. Исключение составили животные мезенхимальной группы с показателем площади интерстициальной соединительной ткани ($34,13 \pm 2,62\%$).

Анализ суммарного содержания клеток Лейдига в интерстициальной ткани семенников позволил установить (таблица), что у подопытных крысят всех групп данный показатель достоверно снижен по сравнению с контролем. Наибольший интерес представляют данные о содержании активных, то есть тестостеронпродуцирующих клеток Лейдига. Нами установлено, что у подопытных крысят всех групп количество активных эндокриноцитов существенно уменьшено, а число неактивных клеток увеличено по сравнению с группой контроля (таблица), что обусловило резкое снижение у них индекса активности клеток Лейдига. При этом изменился коэффициент (K_1), отражающий отношение суммарного количества клеток Лейдига к общему количеству сперматогенных клеток из расчета на один семенной извитой каналец. Как видно из таблицы, у новорожденных крысят алкогольной и, особенно, аутоиммунной групп данный показатель увеличился, а у животных мезенхимальной и, особенно, лекарственной групп, снизился по сравнению с группой контроля.

Кроме того, учитывая тесные паракринные взаимоотношения между клетками Лейдига и sustentоцитами (клетками Сертоли), нами проведен анализ ко-

Характеристика клеток Лейдига экспериментальных животных (М ± m)

Группа	Суммарное количество клеток Лейдига	Активные клетки Лейдига		Неактивные клетки Лейдига		Индекс активности клеток Лейдига	K ₁	K ₂
		Абс.	%	Абс	%			
К	47,40 ± 0,27	45,07 ± 0,50	70,28 ± 0,68	19,06 ± 0,18	29,72 ± 0,20	2,37 ± 0,08	2,66 ± 0,09	12,16 ± 0,07
Ал	6,91 ± 1,67*	52,18 ± 0,43*	52,12 ± 0,48*	47,94 ± 0,46*	47,88 ± 0,58*	1,09 ± 0,02	2,93 ± 0,95*	1,34 ± 0,09*
М	16,98 ± 0,93*	24,78 ± 0,85*	62,28 ± 0,67*	15,01 ± 0,72*	37,72 ± 0,67*	1,65 ± 0,04*	1,26 ± 0,07*	0,68 ± 0,04*
А	7,98 ± 0,85*	19,72 ± 0,56*	37,01 ± 0,10*	33,56 ± 1,12*	62,99 ± 0,30*	0,59 ± 0,04*	5,36 ± 0,91*	1,09 ± 0,05*
Л	9,73 ± 0,90*	12,42 ± 0,90*	67,21 ± 0,58*	6,06 ± 0,38*	32,79 ± 0,55*	2,05 ± 0,05*	0,78 ± 0,07*	0,28 ± 0,03*

Примечание. * — результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

эффицента, отражающего отношение суммарного количества клеток Лейдига к таковому sustentоцитов из расчет на один семенной извитой каналец (K₂). Установлено, что у потомства самок с хронической патологией гепатобилиарной системы происходит существенное снижение данного показателя (таблица). Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее выраженное его снижение имеет место у новорожденных крысят лекарственной группы.

Известно, что реализация репродуктивной стратегии млекопитающих осуществляется, прежде всего, благодаря тестостерону, основным местом биосинтеза которого являются интерстициальные эндокриноциты — клетки Лейдига. Многочисленными исследованиями показано, что клетки Лейдига формируются, подвергаются пролиферации и дифференцировки еще в антенатальном периоде [6]. Несмотря на то, что клетки Лейдига своей дефинитивной формы достигают только в постнатальном периоде (например, у крыс это происходит только к концу периода полового созревания), уже в антенатальном периоде они выступают в качестве индуктора половой дифференцировки уrogenитального тракта, а также влияют на нейроэндокринную регуляцию секреции гонадотропных гормонов. Во взрослом организме интерстициальные эндокриноциты активно участвуют в регуляции различных этапов сперматогенеза [6]. Вместе с тем, не вызывает сомнений, что регуляция сперматогенеза в клетках Лейдига представляет собой сложный процесс, в который вовлечены практически все уровни гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы [11]. В свете вышеизложенного, нам представляется, что при моделировании поражения гепатобилиарной системы у самок крыс происходит нарушение многочисленных функций печени, в результате чего происходит накопление продуктов метаболизма, в том числе азотистых шлаков, обладающих токсическим действием, неинaktivированных гормонов, в том числе половых, а также антител и сенсibilизированных лимфоцитов, которые проникают через гематоплацен-

тарный барьер к плоду. Учитывая данные литературы [4, 5], логично предположить, что изменения условий внутриутробного развития в силу патологии гепатобилиарной системы, могут обусловить нарушение гипоталамо-гипофизарно-гонадных взаимоотношений. Эти данные тесно согласуются с результатами [12], свидетельствующими о нарушении структурного становления гипоталамических мелкоклеточных и крупноклеточных нейросекреторных ядер у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы. В конечном итоге, нарушения гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы у данной группы животных приводят к нарушению процессов формирования, пролиферации и начальной дифференцировки интерстициальных эндокриноцитов и, как следствие, становления сперматогенного пласта в семенных извитых канальцах.

Список литературы

- Кулаков В.И., Леонова В.В., Кузьмичева Л.Н. *Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии*. М.: Медицинское информационное агентство; 2005.
- Боголюбов С.В., Витязева И.И., Макарова Н.П., Павлова А.Г. Клиническое ведение пациентов с тератозооспермией в циклах вспомогательных репродуктивных технологий. *Доктор.Ру*. 2009; 6 (50): 34-8.
- Чалый М. Репродуктивная функция мужчин в 21 веке. *Врач*. 2009; 6: 6-7.
- Потапов С.Н., Торголь Н.И., Андреев А.В. Морфологические особенности клеток Лейдига плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией. *Медицина сегодня и завтра*. 2011; 4(53): 23-6.
- Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С. *Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология*. Черновцы: Мед. академия; 2007.
- Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. *Клетки Лейдига семенных канальцев (онтогенез, ультраструктура, цитопатология, факторы и механизмы регуляции)*. Оренбург: Изд-во ОрГМА; 2010.
- Буров Ю.В. Изменения гонадотропной функции гипофиза крыс при развитии экспериментального алкоголизма. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1986; 12 (6): 675-6.

8. Маянский Д.Н., Иопкер А.И., Коудстоал Я., Кардонк М.Дж. Индукция гранулематозного воспаления печени неинфекционными частицами. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1990; 5: 45-9.

9. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. *Методические указания по изучению гепатопротективной активности фармакологических веществ*. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.

10. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1983; 3: 66-72.

11. Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. Морфофункциональная характеристика гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы крыс-самцов в условиях эмоционально-болевого стресса (ЭБС). *Морфология*. 1996; 110 (5): 38-42.

12. Кузнецова А.Б., Брюхин Г.В. Особенности становления аркуатного нейросекреторного ядра гипоталамуса у потомства самок крыс с хроническим алкогольным поражением печени. *Вестник Южно-Уральского государственного университета*. 2005; 4 (44): 120-6.

Поступила 18.09.14

References

1. Kulakov V.I., Leonova V.V., Kuz'micheva L.N. *Treatment of female and male infertility. Assisted Reproductive Technologies*. Moscow: Medical Information Agency, 2005. (In Russian)

2. Bogolyubov S.V., Vityazeva I.I., Makarova N.P., Pavlova A.G. Clinical management of patients with teratozoospermia in cycles of assisted reproductive technologies. *Doktor.Ru*. 2009; 6 (50): 34-8. (In Russian)

3. Chalyu M. Men reproductive function in the 21st century. *Vrach*. 2009; 6: 6-7 (In Russian)

4. Potapov S.N., Torgol' N.I., Andreev A.V. Morphological features of Leydig cells from fetuses and newborns of

mothers with preeclampsia. *Meditsina s'ogodni i zavtra*. 2011; 4(53): 23-6. (In Russian)

5. Reznikov A.G., Pishak V.P., Nosenko N.D., Tkachuk S.S. *Prenatal stress and neuroendocrine pathology*. Chernovtisi: Medical Academy, 2007. (In Russian)

6. Shevlyuk N.N., Stadnikov A.A. *Leydig cells of the testes of vertebrates (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation)*. Orenburg: Publisher OrG-MA; 2010. (In Russian)

7. Burov Yu.V. Change of gonadotropic pituitary function in rats during the development of experimental alcoholism. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1986; 12 (6): 675- 6. (In Russian)

8. Mayanskiy D.N., Iopker A.I., Koudstoal Ya., Kar-donk M.Dzh. Induction of granulomatous inflammation of the liver by non communicable particles. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1990; 5: 45-9. (In Russian)

9. Vengerovskiy A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. *Methodological guidance on the study of hepatoprotective activity of pharmacological substances. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological agents*. Moscow: Medical, 2005. (In Russian)

10. Ukhov Yu.I., Astrakhantsev A.F. Morphometric methods in the rating of the functional state of the testes. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1983; 3: 66-72. (In Russian)

11. Stadnikov A.A., Shevlyuk N.N. Morphofunctional characteristics of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of male rats under emotional and painful stress. *Morfologiya*. 1996; 110 (5): 38-42. (In Russian)

12. Kuznetsova A.B., Bryukhin G.V. Features of formation of neurosecretory arcuate nucleus of the hypothalamus in the posterity of female rats with chronic alcoholic liver disease. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta*. 2005; 4 (44): 120-6. (In Russian)

Received 18.09.14

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич, д.м.н., проф. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru