

И.Ю. Саяпина, С.С. Целуйко

## ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК ЛЕЙДИГА ПРИ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Амурская государственная медицинская академия,  
675000, ул. Горького, 95, тел.: 8(4162)-52-53-56, e-mail: agma@nt.ru, г. Благовещенск

Несмотря на то, что интерстициальные эндокриноциты семенников, или КЛ, впервые были открыты Францем Лейдигом еще в XIX в., в XXI в. ученые продолжают проявлять повышенный интерес к их изучению [1, 10, 11, 14, 15]. Большинство научных исследований, посвященных интерстициальным эндокриноцитам семенников, носит экспериментальный характер [1, 10, 11, 14, 15]. В последние годы активно изучаются вопросы пролиферации, дифференцировки и регенерации клеток Лейдига (КЛ) [1, 11, 15], есть новые работы, касающиеся вопросов регуляции функций КЛ [10, 11], обширная группа исследований посвящена изучению КЛ при взаимодействии организма с неблагоприятными факторами внешней среды [1, 3, 8, 14].

Цель экспериментального исследования — изучить динамику количественных показателей КЛ крыс при адаптации организма к низким сезонным температурам.

### Материалы и методы

Исследование было проведено на 100 нелинейных половозрелых белых крысах-самцах с массой тела 200-250 г. Интактные животные, которые содержались в стандартных температурных условиях вивария, составили группу контроля. Крыс 1, 2 и 3 экспериментальных групп охлаждали при температуре -15°C по 3 ч ежедневно в течение 7, 14 и 28 дн. соответственно. На следующий день после окончания охлаждения крысы выводились из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под тиопенталовым наркозом. Все манипуляции проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для морфометрического исследования фрагменты семенников из экваториальной зоны толщиной около 10 мм фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали и заливали в парафин согласно стандартной гистологической схеме, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Количественный анализ КЛ проводили при помощи аппаратно-программного комплекса, состоящего из программного обеспечения для количественного анализа ВидеоТест - Морфология 5.0, цифровой камеры DCM 130, адаптированной к световому микроскопу «Микромед-1», и персонального компьютера. Измеряли диаметры ядра и цитоплазмы КЛ, производили подсчет КЛ, приходящихся на поперечный срез одного извитого семенного канальца [6], определяли процент количества малых, средних и больших КЛ, рассчитывали индекс активности КЛ [1, 6].

Учитывая важную роль окислительного стресса в адаптационном процессе, в ткани семенников определяли концентрацию продуктов перекисного окисления ли-

### Резюме

Изучена динамика количественных показателей клеток Лейдига (КЛ) крыс при адаптации организма к низким сезонным температурам. Установлено, что на ранних сроках адаптации нарушается соотношение основных морфофункциональных типов КЛ, снижается индекс активности КЛ, уменьшаются их размеры. В ходе дальнейшей адаптации восстанавливается соотношение активных и неактивных КЛ и размеры КЛ, но относительное количество КЛ уменьшается. В более поздние сроки адаптации, несмотря на дальнейшее снижение относительного количества эндокриноцитов, увеличиваются размеры КЛ, индекс активности КЛ также повышается.

Ключевые слова: клетки Лейдига, количественный анализ, адаптация, низкие температуры.

I.Y. Sajapina, S.S. Tselujko

### DYNAMICS OF QUANTITATIVE INDICATORS OF LEYDIG CELLS UNDER THE ADAPTATION OF ORGANISM TO LOW TEMPERATURES

The Amur state medical academy, Blagoveshchensk

### Summary

The dynamics of quantitative indicators of the rats Leydig cells (LC) under the adaptation to low seasonal temperatures has been studied. We have found that the early stages of adaptation, the ratio of the main morphofunctional types of LC violates, leading to decrease of their index activity. Then the ratio of active and inactive LC recovered, but the relative number LC decreases. At the later periods, despite the further reduction to the relative number of endocrine cells, the activity index of LC increases, cells size also increases.

Key words: Leydig cells, quantitative analysis, adaptation, low temperatures.

пидов — диеновых конъюгатов (ДК) и гидроперекисей липидов (ГЛ), и главного компонента антиокислительной системы — витамина Е.

Для статистической обработки количественных данных использовали программное обеспечение Statistica 6.0, выборки сравнивались при помощи t-критерия Стьюдента, различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Количественный анализ показал (рис. 1), что в интерстициальной соединительной ткани интактных крыс

**Морфометрические и количественные характеристики КЛ ( $M \pm m$ )**

Группа	Диаметр ядра КЛ (мкм)	Диаметр цитоплазмы КЛ (мкм)	Относительное кол-во КЛ (число)
Контроль	6,23±0,02	8,31±0,03	10,9±0,4
1 группа	6,13±0,02*	7,76±0,05*	11,4±0,4
2 группа	6,19±0,01	8,06±0,03*	9,0±0,3*
3 группа	6,57±0,03*	9,04±0,04*	8,8±0,3*

Примечание. \* — различия статистически достоверны с контролем при  $p < 0,05$ .

присутствуют КЛ различных морфофункциональных типов, а именно малые, средние и большие [1, 6]. На долю малых КЛ приходится 42% от общего количества, доля средних КЛ составила 55%, больших — 3% (рис. 1). Согласно литературным данным, КЛ малых размеров являются малоактивными в отношении стероидогенеза и представляют собой инволюционирующие формы [1, 9, 13]. КЛ среднего и большого размера являются клетками, активно продуцирующими стероидные гормоны [1, 9, 13]. Индекс активности КЛ у интактных крыс, отражающий отношение активных КЛ к неактивным, составил 1,38. Морфометрические и количественные характеристики КЛ интактных крыс, представленные в таблице, согласуются с литературными данными [9, 13]. Содержание основных продуктов ПОЛ и витамина Е в ткани семенников интактных крыс отображено на рис. 2.

Обзорная микроскопия показала, что в семенниках интактных крыс КЛ располагаются в интерстициальной соединительной ткани в виде скоплений, состоящих из 10-25 клеток. От клеток соединительной ткани, присутствующих в интерстиции, их отличают большой размер и оксифильно окрашивающаяся цитоплазма. Форма КЛ отличается большой вариабельностью и зависит от локализации клетки и плоскости среза. Ядра КЛ достаточно крупные, имеют округлую или овальную форму. В ядрах преобладает эухроматин, гетерохроматин представлен в виде мелких глыбок, равномерно распределенных по объему ядра, хорошо различимы ядрышки.

Согласно данным количественного анализа, у животных 1 группы (табл.) относительное количество КЛ, приходящееся на поперечный срез извитого семенного канальца, не имеет различий с группой контроля, диаметр ядра и цитоплазмы КЛ уменьшается ( $p < 0,05$ ). В популяции КЛ на 7% увеличивается численность малых форм, численность средних и больших форм КЛ уменьшается на 6 и 1% соответственно (рис. 1), что приводит к снижению индекса активности КЛ до 1,04.

Увеличение численности КЛ малого размера, относящихся к малоактивным в отношении стероидогенеза формам [1, 9, 13], и уменьшение количества средних и больших форм КЛ, активно участвующих в синтезе стероидных гормонов [1, 9, 13], может стать причиной дефицита андрогенов на ранних сроках адаптации организма к низким температурам. Уменьшение диаметра ядра и цитоплазмы КЛ также указывает на угнетение их функциональной активности. Снижение уровня тестостерона у крыс было отмечено при остром холодном стрессе, при иммобилизационном стрессе, при окислительном стрессе, индуцированном природными токсикантами и лекарственными препаратами [1-3, 5, 8].

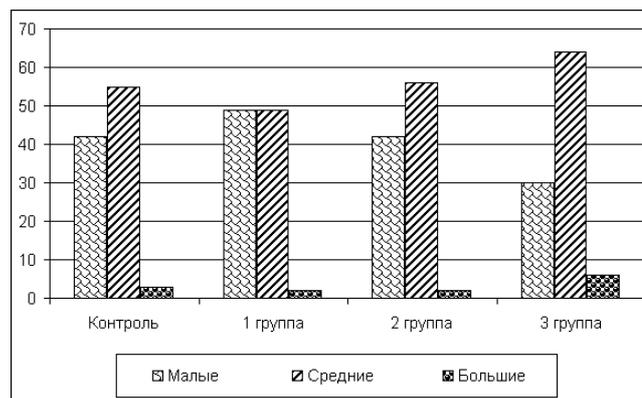


Рис. 1. Распределение КЛ на три основных морфофункциональных типа (%)

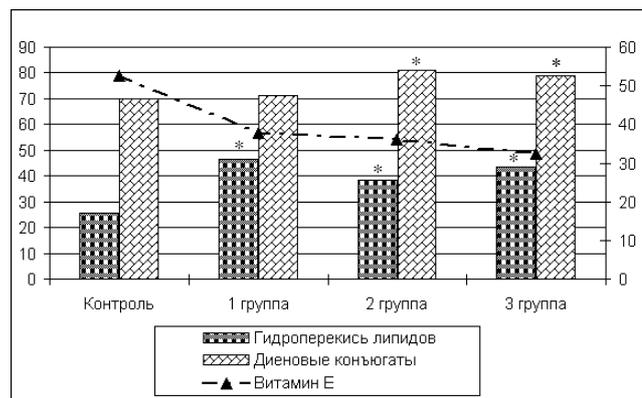


Рис. 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и витамина Е в ткани семенников крыс.  
Примечание. \* — различия достоверны с контролем при  $p < 0,05$ .

Обзорная микроскопия показала, что при адаптации организма к низким температурам в течение 1 нед. КЛ не проявляют видимых отличий от КЛ интактных крыс. Данные биохимического исследования показывают, что уже на ранних сроках адаптации организма к низким температурам в семенниках развивается окислительный стресс (рис. 2). По сравнению с интактными животными, содержание ГЛ в тканях семенника увеличивается на 81%, и на 28% снижается содержание витамина Е ( $p < 0,05$ ).

Экспериментально доказано, что окислительный стресс в семенниках крыс угнетает активность  $3\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназы и  $17\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназы, играющих ключевую роль в синтезе тестостерона в микросомальных фракциях клеток Лейди-га [14]. Следовательно, развитие окислительного стресса в семенниках на ранних сроках адаптации к низким температурам может угнетать синтез тестостерона через подавление ферментных систем в КЛ.

Количественный анализ показал (таблица), что в интерстициальной соединительной ткани семенников крыс 2 группы на 17% уменьшается относительное количество КЛ, приходящееся на один поперечный срез извитого семенного канальца ( $p < 0,05$ ). Диаметр ядер КЛ не имеет статистических различий с группой контроля, диаметр цитоплазмы по-прежнему немного меньше ( $p < 0,05$ ). Распределение КЛ соответствует трем основным морфофункциональным типам, а следовательно, и индекс активности КЛ соответствует группе контроля (рис. 1).

При обзорной микроскопии семенников крыс 2 экспериментальной группы можно отметить обеднение интерстициальной соединительной ткани КЛ, но морфологические характеристики КЛ 2 группы не отличаются от группы контроля. Биохимическое исследование показывает (рис. 2), что на фоне 2-недельной адаптации к холоду содержание ГЛ в ткани семенника превышает показатели контрольной группы на 48%, на 16% увеличивается содержание ДК, витамина Е становится меньше на 31% ( $p < 0,05$ ).

Количественный анализ показал (таблица), что у крыс 3 группы относительное количество КЛ, приходящееся на один извитой семенной каналец, уменьшается на 19% ( $p < 0,05$ ). Диаметры ядра и цитоплазмы КЛ у крыс 3 группы, напротив, увеличиваются на 5,4 и 8,7% соответственно ( $p < 0,05$ ). В популяции интерстициальных эндокриноцитов доля малых КЛ уменьшается на 12%, доля средних КЛ увеличивается на 9%, доля больших КЛ увеличивается на 3% (рис. 1), индекс активности КЛ повышается до 2,33.

При обзорной микроскопии семенников крыс 3 группы по-прежнему отмечается обедненность интерстициальной соединительной ткани КЛ. Изменяются морфологические характеристики эндокриноцитов. Преобладающим морфофункциональным типом становятся средние и большие КЛ округлой или овальной формы со светло-оксифильной вакуолизированной цитоплазмой, что указывает на их активное участие в синтезе стероидов [1, 9]. Ядра КЛ в состоянии повышенной функциональной активности светлые, так как практически не содержат гетерохроматина, имеют крупные ядрышки.

Как показывает биохимическое исследование (рис. 2), в тканях семенника крыс 3 экспериментальной группы сохраняются проявления окислительного стресса. Содержание ГЛ в ткани семенника остается повышенным на 68%, ДК — на 13%, а содержание витамина Е снижено на 18% ( $p < 0,05$ ).

В настоящее время окислительный стресс рассматривается учеными в качестве основной причины, вызывающей программируемую гибель клеток [7, 12]. Мы полагаем, что в нашем исследовании окислительный стресс также выступает в роли индуктора апоптоза КЛ, приводя к снижению их численности. В пользу данной гипотезы свидетельствует уменьшение относительного количества КЛ за счет малых форм, представляющих собой инволюционирующие клетки Лейдига, малоактивные в отношении стероидогенеза [1, 9, 13]. Однако параллельно уменьшению относительного количества интерстициальных эндокриноцитов, у крыс 3 группы отмечается гипертрофия КЛ, подтвержденная методами количественного анализа, которая в совокупности с повышением индекса активности КЛ рассматривается нами как компенсаторно-приспособительная реакция.

Обзор печатных работ показывает, что изменения эндокринного аппарата семенников крыс при стрессе различной этиологии имеют выраженный депрессивный характер [2, 3, 5, 8, 14] и заключаются в стойком уменьшении количества КЛ и снижении уровня тестостерона в крови животных.

Изучение динамики количественных показателей КЛ при адаптации к низким температурам показало, что депрессивные изменения интерстициальных эндокриноцитов в большей степени характерны для ранних сроков

адаптации. Уже после 4 нед. адаптации, что соответствует окончанию первой фазы адаптации организма к низким сезонным температурам [4], эндокринный аппарат семенников претерпевает компенсаторно-приспособительные преобразования в виде гипертрофии и повышения индекса активности КЛ. Подобное ремоделирование эндокринного аппарата семенников, на наш взгляд, обеспечивает выработку стероидов КЛ в количестве, достаточном для обеспечения репродуктивной функции организма в условиях адаптации к экстремальным факторам среды.

### Выводы

1. После 1 нед. адаптации изменения количественных показателей КЛ имеют депрессивный характер: нарушается соотношение основных морфофункциональных типов КЛ, а именно процент количества малых форм КЛ увеличивается, процент количества средних и больших КЛ уменьшается, что приводит к снижению индекса активности КЛ, размеры ядра и цитоплазмы КЛ уменьшаются.

2. После 2 нед. адаптации уменьшается относительное количество КЛ, соотношение основных морфофункциональных типов КЛ, индекс активности КЛ и размеры цитоплазмы КЛ соответствуют показателям интактных крыс.

3. После 4 нед. адаптации относительное количество КЛ остается уменьшенным, однако процент количества средних и больших КЛ увеличивается, процент количества малых КЛ уменьшается, что приводит к увеличению индекса активности КЛ, появляются количественные признаки гипертрофии КЛ в виде увеличения размеров ядра и цитоплазмы.

### Л и т е р а т у р а

1. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л., Романов А.С. Характеристика инкреторной функции семенников потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различного генеза // Вопросы морфологии XXI в. Вып. 2: сб. науч. тр. - СПб.: Изд-во «Деан», 2010. - С. 70-75.

2. Дмитриева О.А., Шерстюк Б.В. Влияние стрессиндуцированного снижения уровня тестостерона на гистохимические изменения половых органов крыс // Тихоокеанский мед. журнал. - 2007. - №3. - С. 55-57.

3. Логинов П.В. Влияние витамина Е ( $\alpha$ -токоферола) на гипоталамо-гипофизарно-гонадную систему самцов белых крыс при окислительном стрессе, индуцированном природными токсикантами: автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Астрахань, 2004. - 24 с.

4. Машанов А.А., Бульгин Г.В. Изменения некоторых регуляторных параметров организма человека в процессе адаптации к экологическим условиям Крайнего Севера // Вестник КрасГАУ. - 2006. - №10. - С. 170-172.

5. Потёмина Т.Е. Нарушение сперматогенеза в условиях стресса у самцов крыс // Бюл. экспер. биол. и мед. - 2008. - Т. 145, №6. - С. 645-647.

6. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников // Архив анат., гист. и эмбр. - 1983. - Т. 84, №3. - С. 66-72.

7. Almeida M., Han L., Ambrogini E. et al. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- $\kappa$ B in osteoblastic cells via a PKC ( $\beta$ /p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens // Molecular Endocrinology. - 2010. - Vol. 24, №10. - P. 2030-2037.

8. Armagan A., Uzar E., Uz E., Yilmaz H.R. et al. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat // Human & Experimental Toxicology. - 2006. - Vol. 25. - P. 119-125.

9. Bergh A. Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidens for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules // Int. J. Androl. - 1982. - Vol. 5, №3. - P. 325-330.

10. Del Bravo J., Catizone A., Ricci G. et al. Hepatocyte growth factor modulates rat Leydig cell functions // J. of Androl. - 2007. - Vol. 28, №6. - P. 866-874.

11. Hales D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis // J. of Reproductive Immunol. - 2002. - Vol. 57, №1. - P. 3-18.

12. Husain P.S., Amstad P., He P., Robles A. et al. p-53-mediated oxidative stress and apoptosis // Toxicol. Pathol. - 2004. - Vol. 32, №1. - P. 163-164.

13. Mori H., Christensen A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis // J. Cell Biol. - 1980. - Vol. 84, №2. - P. 340-354.

14. Rajeswary S., Kumaran B., Ilangoan R. et al. Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats // Reprod. Toxicol. - 2007. - Vol. 24, №3-4. - P. 371-380.

15. O'Shaughnessy P.J., Morris I.D., Baker P.J. Leydig cell regeneration and expression of cell signaling molecules in the germ cell-free testis // Reproduction. - 2008. - Vol. 135, №6. - P. 851-858.

*Координаты для связи с авторами: Саяпина Ирина Юрьевна* — канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии АГМА, тел.: 8(4162)-52-53-56, e-mail: irina6336@mail.ru; *Целуйко Сергей Семенович* — доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии АГМА, тел.: 8(4162)-52-53-56, e-mail: agma@nm.ru.



УДК 616 - 001.186 : 651.3

О.Н. Ли, В.А. Доровских, М.А. Штарберг

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АРАБИНОГАЛАКТАНА В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

*Амурская государственная медицинская академия,  
675000, ул. Горького, 95, тел.: 8(4162)-52-68-28, г. Благовещенск*

Хорошо известно, что в возникновении и развитии многих патологических состояний организма человека важную роль играют реакции свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул, и в первую очередь, нарушения в системе регуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [11].

Инициаторами ПОЛ в организме выступают активные формы кислорода (АФК), источниками которых могут быть митохондрии, ксантиноксидаза (КСО), полиморфно-ядерные лейкоциты (ПЯЛ) крови. Продукция также может осуществляться в процессе фотохимических реакций, метаболизма арахидоновой кислоты и катехоламинов, появления каталитически активного железа [6]. Активация ПОЛ затрагивает важнейшие характеристики липидной фазы клеточных мембран: заряд, вязкость, мембранную проницаемость, вызывает нарушения, обусловленные искажением белок-липидных взаимодействий, приводит к повреждению мембранно-связанных ферментных систем продуктами окислительной деградации липидов и т.д. [7]. Это послужило патогенетическим обоснованием применения экзогенных антиоксидантов (АО) для лечения заболеваний, протекающих на фоне синдрома липидной перекисидации. В настоящее время имеется большой опыт клинического использования

природных и синтетических АО [4, 15]. Однако при всем многообразии АО, практическое внедрение получают те препараты, которые наряду с выраженной антиокислительной активностью характеризуются доступностью и стабильной сырьевой базой.

Широкое поле деятельности для поиска АО представляют соединения флавоноидной природы растительного происхождения. Показано, что многие из флавоноидов имеют антиоксидантные свойства [3, 14]. В частности, к ним относится арабиногалактан (АГ) — липофильное вещество, имеющее ряд весьма ценных качеств. Во-первых, АГ обладает высокой гепатотропностью, способностью вступать в реакции с различными функциональными реагентами, образовывать с ними конъюгаты, уменьшать интенсивность свободнорадикальных процессов, активировать фагоцитоз. Доказано, что арабиногалактан обладает мембранопротекторным действием, а также проявляет свойства антиоксиданта и иммуномодулятора [5]. Во-вторых, богатым сырьем для промышленного получения АГ может служить древесина лиственницы сибирской (*Larix occidentalis*) [2]. При этом производство АГ основано на доступном отечественном сырье без каких-либо ограничений, поскольку стадия его получения совмещена с технологией производства целлюлозы.