

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

УДК 611—013.12:616.69—001.8—076.5

Поступила 19.04.2011 г.



О.Н. Шевантаева, к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии;
Ю.И. Косюга, к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — изучить возможности оценки состояния сперматогенеза после перенесенной острой гипобарической гипоксии с помощью цитоморфометрического метода исследования ткани семенников.

Материалы и методы. Работа выполнена на 50 половозрелых самцах белых беспородных крыс массой 230–250 г. Моделирование острой гипоксии осуществляли в проточной барокамере.

Заключение. Цитоморфологический метод исследования ткани семенников позволяет установить, что после перенесенной острой гипобарической гипоксии происходят выраженные изменения клеточного состава семенников, снижается количество всех популяций клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига, что свидетельствует о серьезных нарушениях сперматогенеза.

Ключевые слова: цитоморфологическое исследование, гипоксия, сперматогенез.

English

The use of cytomorphological method to assess spermatogenesis in hypoxia

O.N. Shevantaeva, PhD, Associate Professor, the Department of Pathological Physiology;

Y.I. Kosyuga, PhD, Associate Professor, the Department of Pathological Physiology

Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

The aim of the investigation is to study the assessment possibilities of spermatogenesis after acute hypobaric hypoxia using cytomorphological investigation of spermary tissue.

Materials and Methods. The experiments were carried out on 50 mature male non-pedigree white rats weighing 230–250 g. Acute hypoxia was simulated in flow low-pressure chamber.

Conclusion. Cytomorphological investigation of spermary tissue enables to state that after acute hypobaric hypoxia there occur marked changes of spermary cell structure, the number of all cell populations of seminiferous epithelium decreases, including Sertoli cells and Leydig cells. It is indicative of serious disorders of spermatogenesis.

Key words: cytomorphological investigation, hypoxia, spermatogenesis.

Сперматогенез — сложный циклический процесс клеточных превращений, происходящий в извитых семенных канальцах яичек самцов млекопитающих, в результате

которого образуются зрелые половые клетки (сперматозоиды), способные к оплодотворению [1, 2]. Сперматогенез подразделяют на три фазы:

Для контактов: Шевантаева Ольга Николаевна, тел. раб. 8(831)465-54-86, тел. моб. + 7 906-357-03-45; e-mail: shevantaeva@list.ru

митотическую — сперматогонии делятся, дают начало сперматоцитам и одновременно поддерживают свое количество;

мейоз — происходит два деления созревания, в результате второго образуются сперматиды;

спермиогенез — сперматиды подвергаются трансформациям и превращаются в сперматозоиды [2].

Установлено, что временной цикл развития сперматогенного эпителия стабилен, отличается видовой специфичностью и составляет у крыс 48 дней [3].

Сперматогенез является сложным энергозависимым процессом, весьма чувствительным к дефициту кислорода, что обуславливает его высокую ранимость при различных гипоксических воздействиях.

Гипоксия — широко распространенное явление, возникающее как в условиях дефицита кислорода во внешней среде, так и в результате самых разных патологических состояний, связанных с нарушением функций дыхательной и сердечно-сосудистой систем, а также транспортной функции крови. Во всех случаях, в конечном счете, происходит снижение доставки кислорода к тканям до уровня, недостаточного для поддержания метаболизма, функции и структуры клетки [4, 5].

Для подсчета клеток сперматогенного эпителия, в том числе клеток Сертоли и Лейдига, широко используется метод исследования гистологических срезов семенников. Однако следует учитывать, что на срезах семенных канальцев сперматогенез строго компартиментализирован в соответствии со стадийностью процесса и его синхронизованным распространением в виде «волны» сперматогенеза вдоль оси семенных канальцев. Каждый отдельный срез семенного канальца — одна из стадий сперматогенеза со строгим соответствием количества различных типов сперматогенных клеток [2]. На срезах необходимо либо охватить усредненными подсчетами ткань всего семенника, либо

соотносить результаты подсчетов с каждой из 14 стадий сперматогенеза с предварительной идентификацией этих стадий на специально приготовленных гистологических окрашенных препаратах [6], что является трудоемким и длительным процессом. С учетом вышеизложенного для оценки состояния сперматогенеза сотрудниками кафедры патологической физиологии НижГМА предложено использовать количественный цитоморфологический метод [7]. Он позволяет резко сократить время анализа, рассчитать абсолютное количество различных типов клеток в семеннике, дает малый разброс данных в каждой группе и обеспечивает хорошую воспроизводимость на малых выборках.

Цель исследования — изучить возможности оценки состояния сперматогенеза после перенесенной острой гипобарической гипоксии с помощью цитоморфометрического метода исследования ткани семенников.

Материалы и методы. Работа выполнена на 50 половозрелых самцах белых беспородных крыс массой 230–250 г. Опытную группу составили 40 животных, которых подвергали однократному воздействию острой гипобарической гипоксии. Контролем служили интактные животные (n=10).

Моделирование острой гипоксии осуществляли в точной барокамере. Крыс «поднимали» на высоту 11 500–12 000 м и удерживали «на смертельной площадке» до появления агонального дыхания [8].

Цитоморфологический метод заключается в приготовлении мазков из клеточной суспензии ткани семенников и окрашивании их по Романовскому–Гимзе. Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия в 1 г тестикулярной ткани вычисляется путем математических пропорций, с использованием абсолютного числа сперматозоидов, подсчет которых проводится в камере Горяева.

Полученные данные были статистически обработаны с использованием U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Проведенный нами цитоморфологический анализ ткани семенника показал, что на 3-и сутки постгипоксического периода наблюдалось уменьшение количества всех типов клеток сперматогенного эпителия (рис. 1).

На 14-е сутки эксперимента обнаружены максимальные изменения в спермограмме экспериментальных животных: количество сперматогоний снизилось до $0,80 \pm 0,05$ млн при норме $27,8 \pm 1,1$ млн, сперматоциты составили $5,4 \pm 0,4$ млн (в контроле — $132,2 \pm 7,5$ млн), сперматиды ранние отсутствовали, а число поздних сперматид было снижено более чем в 90 раз ($p = 0,001$).

С 21-х суток эксперимента наблюдалось некоторое увеличение числа всех герминативных клеток. Однако их количество оставалось статистически значимо ниже исходного уровня и на 60-е сутки эксперимента.

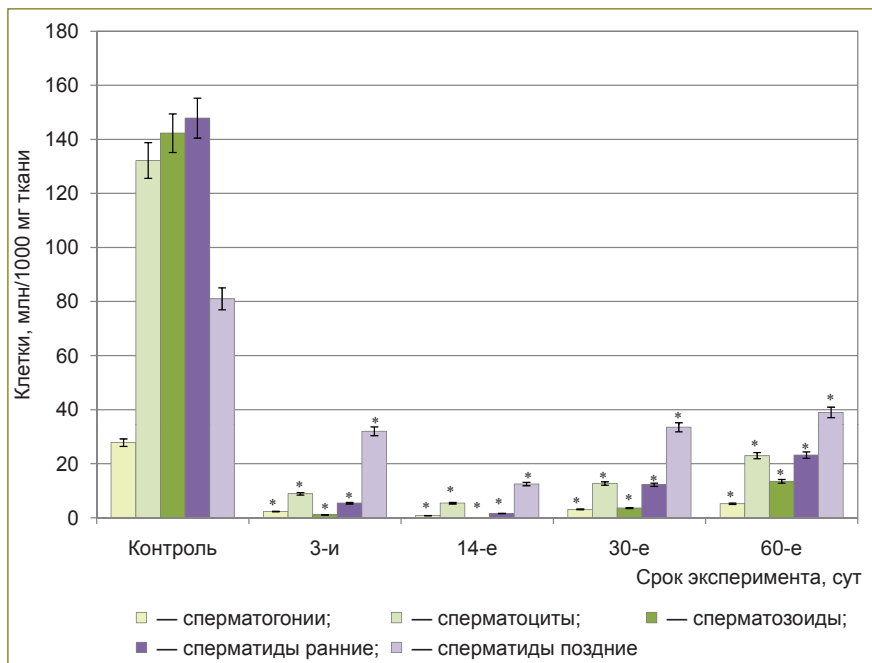


Рис. 1. Количество клеток сперматогенного эпителия при острой гипобарической гипоксии. * — статистическая значимость различий значений между опытной и контрольной группами; $p < 0,001$

Известно, что в норме количество сперматозоидов в тестикулах всегда меньше количества поздних сперматид в связи с элиминацией дефектных сперматозоидов и перемещением зрелых сперматозоидов в придаток [9]. Однако после воздействия острой гипобарической гипоксии количество сперматозоидов в ткани тестикул превышало количество поздних сперматид. Можно полагать, что после экстремальных гипоксических воздействий происходит накопление сперматозоидов в просвете канальцев семенников, потому что образовавшиеся сперматозоиды не способны самостоятельно передвигаться к придатку яичка, а переносятся током жидкости, образуемой клетками Сертоли [10], количество которых в наших экспериментах было значительно снижено до конца периода наблюдения (рис. 2).

После моделирования острой гипобарической гипоксии достоверно снижается и количество клеток Лейдига (см. рис. 2). На 14-е сутки эти клетки обнаружены в тестикулах только у 20% животных. В последующие сроки отмечено постепенное увеличение числа клеток Лейдига, однако и на 60-е сутки наблюдения абсолютное их количество было в 5,8 раза ниже нормы ($p=0,001$).

Можно полагать, что низкая скорость восстановления клеточных субпопуляций герминативного эпителия в отдаленном постгипоксическом периоде связана с резким снижением количества клеток Сертоли и клеток Лейдига в ткани тестикул. Известно, что клетки Сертоли выполняют трофическую функцию по отношению к клеткам сперматогенного эпителия, участвуют в поддержании целостности гематотестикулярного барьера и обеспечивают сохранение в канальцах семенников среды, богатой калием и бикарбонатом, что необходимо для осуществления мейоза и завершения развития сперматозоидов [11]. Клетки Лейдига являются основными продуцентами тестостерона, недостаток которого приводит к снижению мейотического деления сперматоцитов и нарушению их превращения в сперматиды [12].

Заключение. Цитоморфологическое исследование ткани семенников позволяет определить, что после перенесенной острой гипобарической гипоксии происходят выраженные изменения клеточного состава семенников, снижается количество всех популяций клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига, что свидетельствует о серьезных нарушениях сперматогенеза.

References

1. Ruzen-Range E. *Spermatogenez u zhivotnykh* [Spermatogenesis in animals]. Moscow: Mir; 1980; 255 p.
2. Hess R.A., Franca R.L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: C.Y. Cheng (edit.). *Molecular*

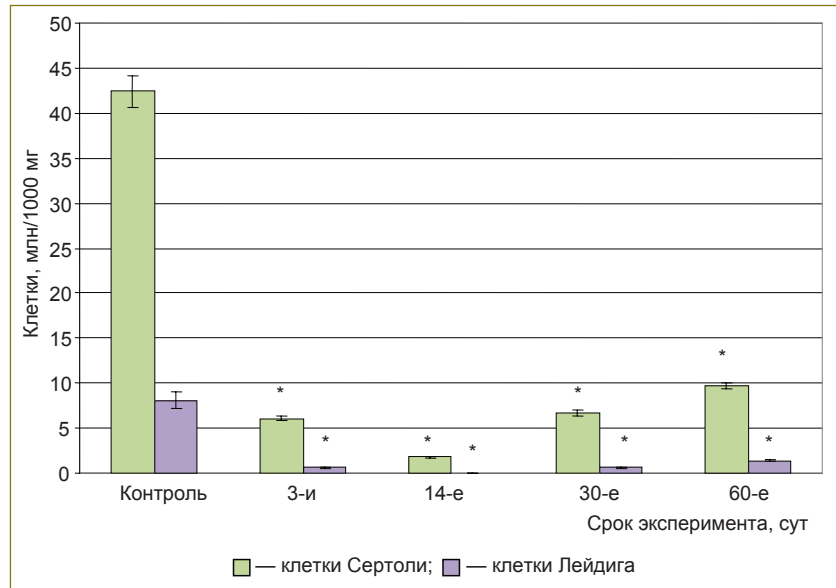


Рис. 2. Количество клеток Сертоли и Лейдига при острой гипобарической гипоксии. * — статистическая значимость различий значений между опытной и контрольной группами; $p < 0,001$

mechanisms in spermatogenesis. Austin, TX: Landes Bioscience/Springer Science; 2008; p. 1–15.

3. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52: 198–235.
4. Agadzhanian N.A. *Funktsii organizma v usloviyakh gipoksii i giperkapnii* [Body functions in conditions of hypoxia and hypercapnia]. Moscow: Meditsina; 1986; 272 p.
5. Luk'yanova L.D. *Bull Eksp Biol Med* 1997; 9: 244–253.
6. Ivanov Yu.V. *Gigiena i sanitariya* 1986; 4: 52–55.
7. Potemina T.E., Artifeksov S.B. *Sposob kolichestvennoy otsenki effektivnosti spermatogeneza* [The method of quantitative estimation of spermatogenesis effectiveness]. Patent RF 2231979. 2004.
8. *Metodicheskie rekomendatsii po eksperimental'nomu izucheniyu preparatov, predlagaemykh dlya klinicheskogo izucheniya v kachestve antigipoksicheskikh sredst* [Methodological recommendations on experimental study of pharmaceuticals suggested for clinical studies as antihypoxic agents]. Pod red. L.D. Luk'yanovoy [L.D. Luk'yanova (editor)]. Moscow: Meditsina; 1990; 18 p.
9. *Reproduktivnaya endokrinologiya* [Reproductive endocrinology]. Pod red. S.S.K. Yena, R.B. Dzhafe [S.S.K. Yena, R.B. Dzhafe (editor)]. Moscow: Meditsina; 1998; 704 p.
10. Pshenichnikova T.Ya. *Besplodie v brake* [Infertility within marriage]. Moscow: Meditsina; 1991; 317 p.
11. Cheng C.Y., Mruk D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli–germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825–874.
12. Cheng C.Y., Mruk D.D. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Phil Trans R Soc* 2010; 365(1546): 1459–1463.