

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ ПОСЛЕ ПРИЦЕЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЕННИКОВ КРЫС ЭЛЕКТРОНАМИ В ДОЗЕ 8 ГРЕЙ

Г.А. Демяшкин^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва;

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии», г. Обнинск

Дана морфологическая оценка сперматогенеза при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами, после облучения электронами в дозе 8 Грей. Через неделю после облучения обнаружили резкое снижение количества половых клеток; уменьшение площади семенника и высоты сперматогенного эпителия; появление семенных шаров. Положительные эффекты после применения LP-PRP+IGF наблюдали уже на третьей неделе, которые сохранялись на протяжении всего эксперимента. Ростовые факторы плазмы, обогащенной тромбоцитами, в комбинации с IGF, способствуют активации низкодифференцированных сперматогоний и восстановлению пула половых клеток после облучения импульсным ускорителем электронов «NOVAC-11» в дозе 8 Грей.

Ключевые слова: сперматогенез, бесплодие, облучение, LP-PRP.

DOI 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-52-55

INFLUENCE OF GROWTH FACTORS ON SPERMATOGENESIS AFTER AIMED IRRADIATION OF RAT TESTES WITH ELECTRONS IN A DOSE OF 8 GRAY

G.A. Demyashkin^{1,2}

¹FSAEI HE I. M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow;

²Medical Radiological Scientific Center named after A. F. Tsyba – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk

The morphological assessment of spermatogenesis using platelet-enriched plasma after electron irradiation at a dose of 8 Gray was studied. A week after irradiation, a sharp decrease in the number of germ cells was found; decrease in the area of the testis and the height of the spermatogenic epithelium; the appearance of seed balls. Positive effects after the application of LP-PRP + IGF were observed already in the third week, which persisted throughout the entire experiment. The growth factors of platelet-rich plasma in combination with IGF promote the activation of poorly differentiated spermatogonia and the restoration of the pool of germ cells after irradiation with the NOVAC-11 pulsed electron accelerator at a dose of 8 Gray.

Key words: spermatogenesis, infertility, radiation, LP-PRP.

Около половины всех случаев бесплодия в семейных парах обусловлено «мужским фактором», а у 2 % мужчин наблюдается снижение функций, качественных и количественных параметров сперматогенеза (олигоспермия и азооспермия) в результате действия на яички одного или нескольких факторов (идиопатический, инфекционный, аутоимунный и другие) [1–3].

Изучение механизмов нарушения сперматогенеза требует создания моделей, для чего могут быть использованы химиотерапевтические цитостатические препараты, а также облучение [4].

Яичко – радиочувствительный орган, в котором дозы общего облучения от 0,1 Гр и выше вызывают обратимые или необратимые повреждения, что связано с сенсбилизацией активно пролиферирующих половых клеток. Количество сперматозоидов и наличие морфологических аномалий были описаны при облучении в дозах от 1 до 2 Гр [5, 6].

Для восстановления сперматогенеза было предложено применение плазмы, обогащенной тромбоцитами

(Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma, LP-PRP), ввиду наличия в ней биологически активных веществ, потенциально способных повышать количественные и качественные характеристики гамет [7].

Была описана способность инсулиноподобного фактора роста увеличивать количество округлых и удлиненных сперматид в культивируемых MTF (mouse testicular fragment) новорожденных, что делает его одним из ключевых факторов роста в LP-PRP.

Исходя из потенциально положительного эффекта плазмы, обогащенной тромбоцитами, а также его усиления путем дополнительного введения IGF, становится возможным их комбинаторное применение в качестве регенеративного субстрата для восстановления фертильности.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Морфологическая оценка сперматогенеза при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами, после облучения электронами в дозе 8 Грей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное морфологическое исследование проводили на базах Сеченовского университета и Экспериментального сектора Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба.

Животные для исследования *in vivo* – самцы крыс Wistar, (220 ± 20) г, 9–10 недель, *n* = 60, содержали в виварии при контролируемой температуре (22 °С) и световом периоде (12L:12D) со свободным доступом к воде и крысиному корму.

Дизайн эксперимента. Экспериментальные животные были случайным образом поделены на 3 группы (условные названия): I – Контроль, II – 8PT, III – 8PT + LP-PRP + IGF. I группе (*n* = 10) вводили 0,9%-й физиологический раствор NaCl интраперитонеально на протяжении всего эксперимента; II группа (*n* = 30) – однократное прицельное облучение электронами (доза – 8 Гр) тазово-брюшного сегмента с использованием линейного акселератора («NOVAC-11», мощность дозы 1 Гр/мин) в первый день эксперимента; III группа (*n* = 20) после однократного облучения животные получали LP-PRP (200 мкл, интраперитонеальная инъекция один раз в неделю в течение 4 недель) и IGF (14 МЕ/кг, 0,333 мг/кг, подкожная инъекция один раз в неделю в течение 4 недель).

Животных всех групп (I–III) выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика. Сроки умерщвления: I группа – на 42-е сут.; II группа – по 5 крыс на 7, 14, 21, 28, 35, 42-е сут.; III группа – по 5 крыс на 14, 21, 28 и 35-е сут. Плазму, обогащенную тромбоцитами (LP-PRP), изготавливали согласно стандартной методике [8].

Морфологический блок. После извлечения оценивали внешний вид семенников, состояние паренхимы на разрезе, взвешивали (в граммах) и измеряли, фиксировали в растворе Буэна, приготавливали парафиновые блоки, а затем срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартной методике.

Морфологический и морфометрический анализ проводили в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа при увеличении ×200 и ×400 в 4 рандомных срезах с каждого образца, перемещая предметные стекла с равными интервалами вдоль осей X и Y,

с использованием полуавтоматического анализатора изображения. Световую микроскопию осуществляли с помощью системы видео-микроскопии (микроскоп Leica DM2000, Германия; камера Leica ICC50 HD; компьютер Platrun LG), а морфометрические данные получали с использованием ПО Olympus DP2-BSW (с версий 2.1 по 2.2, сборка 6212, Токио, Япония).

В каждом из полей рассчитывали следующие параметры: объем паренхимы семенника; диаметр извитых семенных канальцев; количество мужских гамет, клеток Сертоли и Лейдига; высоту сперматогенного эпителия.

Тестикулярную оценку проводили с использованием критериев S. Johnsen.

Статистический анализ. Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12.00 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Сравнение между группами проводилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA со значимостью *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Макро- и микроскопическая оценка. В образцах второй группы отмечали деструктивные изменения семенников: уменьшение количества извитых семенных канальцев в 1,5 раза по сравнению с нормой (600 и 1200 соответственно) и половых клеток; снижение высоты сперматогенного эпителия (ниже 35 мкм) и признаки аплазии. В 1/3 семенных канальцах появились семенные шары (площадь – 0,7 мкм²; диаметр – 0,9 мкм; *p* < 0,05) – округлые структуры с множественными пикнотичными ядрами и оксифильной цитоплазмой. Диаметр единичных составил 0,9 мкм, при *p* < 0,05, что в 1,1 раз больше чем в норме. Оценка по Johnsen – (5,00 ± 0,1) баллов при *p* < 0,05. Количество клеток Сертоли и Лейдига было снижено незначительно. После введения LP-PRP + IGF отмечали восстановление гистоархитектоники, а также увеличение объема и размеров семенников, количества семенных канальцев (до 900) и гамет, восстановление высоты сперматогенного эпителия (табл. 1, 2, 3, рис.).

Таблица 1

Вес и объем семенников в экспериментальных группах, *p* < 0,05

Группы	Вес семенников, г	Объем семенников
Контроль	1,5 ± 0,1	1397,5 ± 140,3
8PT	0,50 ± 0,05*	463,0 ± 43,1*
8PT + LP-PRP + IGF	0,94 ± 0,07**	1019,0 ± 111,8**

* *p* < 0,05 (контроль и 8PT); ** *p* < 0,05 (контроль и 8PT + LP-PRP + IGF)

Таблица 2

Морфометрические данные семенных канальцев в экспериментальных группах, $p < 0,05$

Группа	Площадь семенника, мкм ²	Диаметр семенного канальца, мкм	Высота сперматогенного эпителия, мкм
Контроль	224151,32 ± 44,30	344,4 ± 34,4	110,90 ± 13,05
8PT	43783,46 ± 7,10*	228,19 ± 35,40*	39,4 ± 15,9*
8PT + LP-PRP + IGF	168839,52 ± 31,63**	286,73 ± 34,70**	83,60 ± 14,37**

* $p < 0,05$ (контроль и 8PT); ** $p < 0,05$ (контроль и 8PT + LP-PRP + IGF)

Таблица 3

Количество половых клеток в семенных канальцах при облучении электронами разными дозами, при $p < 0,05$

Группы	Сперматогонии (А и В) ×10 ⁶	Сперматоциты ×10 ⁶	Сперматиды ×10 ⁶	Клетки Сертоли ×10 ⁶	Клетки Лейдига ×10 ⁶
Контроль	117,00 ± 0,31	110,00 ± 0,11	163,00 ± 0,13	12,0 ± 0,2	8,00 ± 0,06
8PT	25,00 ± 0,13*	68,0 ± 0,2*	семенные шары – 18,0 ± 0,2	9,0 ± 0,1*	5,00 ± 0,07*
8PT + LP-PRP + IGF	91,00 ± 0,24**	94,00 ± 0,17**	104,00 ± 0,17**	8,00 ± 0,15**	4,00 ± 0,07**

* $p < 0,05$ (контроль и 8PT); ** $p < 0,05$ (контроль и 8PT + LP-PRP + IGF)

Положительные эффекты после применения LP-PRP + IGF наблюдали уже на третьей неделе, а увеличе-

ние количества половых клеток, близкое к нормальному значению, отмечали к концу исследования (на 42-е сутки).

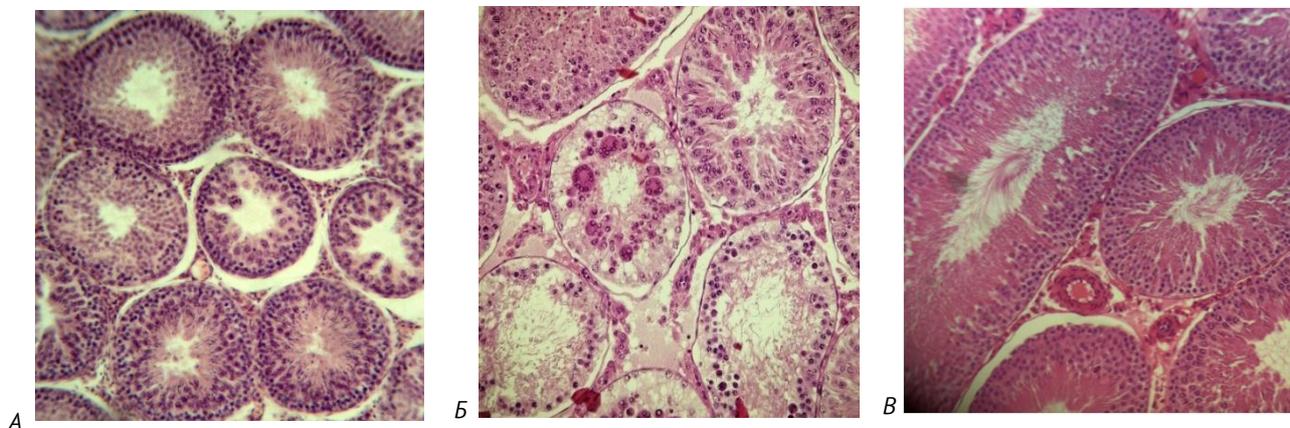


Рис. Семенник, морфологическая картина экспериментальных групп; окраска гематоксилином и эозином, увелич. ×200.

А – контроль; Б – на 7-е сутки после облучения (8 Гр, однократно);
 В – после облучения (8 Гр, однократно) и введения LP-PRP (на 35-е сутки)

Гипосперматогенез является предпосылкой, часто приводящей к нарушению репродуктивной функции и, как следствие, бесплодию в супружеских парах [9].

Темой настоящего исследования впервые послужило изучение влияния факторов роста на гипосперматогенез после прицельного облучения семенников с использованием импульсного ускорителя электронов «NOVAC-11». Резкое снижение количества половых клеток (вследствие нарушения удвоения ДНК), возникшее уже через неделю после

радиоактивного воздействия, сохранялось на протяжении всего эксперимента, что позволило многократно вводить LP-PRP + IGF животным III группы. Тем не менее, степень обнаруженных патоморфологических изменений структур семенника в дозе 8 Гр была значительно ниже, что является отличием от γ -облучения [4, 10].

Выбор срока эксперимента связан с длительностью физиологического сперматогенеза у крыс, в среднем составляющей 52 дня.

Улучшению качественно-количественных характеристик половых клеток и их микроокружения в семеннике, согласно данным из литературных источников, способствует наличие различных факторов роста, которые стимулируют размножение и дифференцировку гамет, а также предотвращают апоптоз, поддерживая пролиферативно-апоптотический баланс [3].

В некоторых исследованиях LP-PRP уже была использована для восстановления сперматогенеза в модели бесплодия, однако полученные результаты оказались противоречивы. Mauduit и соавт. отметил, что при облучении животных в дозах радиации от 0,5 до 4 Гр экспрессия факторов роста снижалась [11]. В связи с этим, в нашем исследовании животным III группы дополнительно вводился IGF, учитывая его положительные эффекты на половые клетки. Введение животным только LP-PRP другими исследователями не дало подобного эффекта [4].

В модели гипосперматогенеза ростовые факторы LP-PRP, активированной CaCl₂, в комбинации с IGF привели к активации низкодифференцированных сперматогоний В-типа и восстановлению пула половых клеток, что частично совпадает с данными других исследователей [4]. Количество клеток Сертоли и Лейдига на протяжении эксперимента во всех группах практически оставалось неизменным в связи с их сенсбилизацией к радиационному воздействию.

Необходимо подчеркнуть, что для появления положительной динамики в семенниках крыс на фоне применения комбинации LP-PRP + IGF необходим правильный выбор концентрации и частоты введения LP-PRP и IGF.

Из всего вышесказанного следует, что ионизирующее облучение семенников животных приводит к гипосперматогенезу, что может быть использовано при создании модели, экстраполированной на мужское бесплодие, а ростовые факторы плазмы, обогащенной тромбоцитами, могут послужить для улучшения LP-PRP-зависимых характеристик сперматогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ростовые факторы плазмы, обогащенной тромбоцитами, в комбинации с IGF способствуют активации низкодифференцированных сперматогоний

и восстановлению пула половых клеток после облучения импульсным ускорителем электронов «NOVAC-11» в дозе 8 Грей.

REFERENCES

1. Kumar N., Singh A.K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci*, 2015, vol. 8 (4), pp. 191–196. DOI:10.4103/0974-1208.170370
2. Chalyi M.E., Akhvlediani N.D., Kharchilava R.R. Male infertility. *Urologiia*, 2017, no. S2, pp. 4–19.
3. Demyashkin G.A. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya*, 2018, no. 60, pp. 208–218. DOI:10.31116/tsitol.2018.03.07.
4. Dehghani F., Sotoude N., Bordbar H., et al. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan. *Platelets*, 2019, vol. 30 (4), pp. 513–520. DOI: 10.1080/09537104.2018.1478400.
5. Khan S., Adhikari J.S., Rizvi M.A., et al. Radioprotective potential of melatonin against 60Co γ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci*, 2015, vol. 61. URL: <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0156-9>.
6. Dergilev A.A., Palyga G.F., Chibisova O.F., et al. Radiation and spermatogenesis: experimental estimation of radiation effect at doses below castrate level on ontogenesis. *Radiation and Risk*, 2012, vol. 21 (4), pp. 51–60.
7. Al-Nasser R., et al. The Effectiveness of autologous platelet-rich plasma (prp) in the therapy of infertile men with non-abstractive azoospermia. *J Reprod Med Gynecol Obstet*, 2018, no. 3. DOI: 10.24966/RMGO-2574/100011
8. Filardo G., Kon E., Roffi A., et al. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc*, 2015, no. 23, pp. 2459–2474.
9. Demyashkin G.A. Inhibin B in seminiferous tubules of human testes in normal spermatogenesis and in idiopathic infertility. *Syst Biol Reprod Med*, 2019, vol. 65 (1), pp. 20–28. DOI:10.1080/19396368.2018.1478470,
10. Marzban M., Anjamshoa M., Jafari P., et al. Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: radioprotective role of silymarin. *Electron Physician*, 2017, vol. 9 (6), pp. 4524–4532. DOI:10.19082/4524.
11. Mauduit C., Siah A., Foch M., et al. Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2001, no. 50, pp. 203–212. DOI: 10.1016/S0360-3016(01)01461-4.

Контактная информация

Демяшкин Григорий Александрович – к. м. н., доцент кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: dr.dga@mail.ru