

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 612.67:611.08:615.357

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-123-127

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕМЕННИКОВ КРЫС
ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМ СТАРЕНИИ,
ВЫЗВАННОМ ТЕМНОВОЙ ДЕПРИВАЦИЕЙ**

Л.И. Кондакова, С.А. Калашникова, Л.В. Полякова, М.В. Букатин

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Автор, ответственный за переписку: Лариса Игоревна Кондакова, larisakondakova@gmail.com

Аннотация. Стремительное развитие технологий оказывает существенное влияние на повседневную жизнь человека. Световое, звуковое, информационное загрязнения приводят к нарушению сна, что оказывает негативное воздействие на физическое состояние. Даже кратковременное нарушение сна, вызванное темновой депривацией, приводит к снижению уровня тестостерона в сыворотке крови. Дисбаланс мужских половых гормонов, синтез которых находится под контролем гипоталамо-гипофизарной системы, негативно влияет на морфофункциональное состояние семенников. На модели преждевременного старения, вызванного 30-дневной темновой депривацией, изучено влияние экзогенного мелатонина на морфофункциональное состояние сперматогенного эпителия семенников, клеток Лейдига у белых беспородных самцов крыс 4-месячного возраста, а также проведена оценка уровня белка Клото в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Было установлено, что морфологические изменения семенников характеризовались уменьшением толщины сперматогенного эпителия на 30-е сут. после темновой депривации и снижением уровня белка Клото, который является маркером преждевременного старения. Введение экзогенного мелатонина оказывало протективное воздействие на морфофункциональный статус семенников животных, сопровождающееся восстановлением сперматогенного эпителия, увеличением белка Клото до уровня показателя группы негативного контроля.

Ключевые слова: семенники, преждевременное старение, темновая депривация, стресс, мелатонин, белок Клото

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

**MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN RAT TESTES DURING PREMATURE AGING
CAUSED BY DARK DEPRIVATION**

L.I. Kondakova, S.A. Kalashnikova, L.V. Polyakova, M.V. Bukatin

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Corresponding author: Larisa I. Kondakova, larisakondakova@gmail.com

Abstract. The rapid development of technology has a significant impact on the daily life of a person. Light, sound, information pollution leads to sleep disturbance, which has a negative impact on the physical condition. Even short-term sleep disturbance caused by dark deprivation leads to a decrease in serum testosterone levels. The imbalance of male sex hormones, the synthesis of which is under the control of the hypothalamic-pituitary system, negatively affects the morphofunctional state of the testes. The effect of exogenous melatonin on the morphological and functional state of the spermatogenic epithelium of the testes, Leydig cells in white outbred male rats of 4 months of age was studied on the model of premature aging caused by 30-day dark deprivation, and the Klotho protein level in blood serum was assessed by enzyme immunoassay. It was found that the morphological changes in the testes were characterized by a decrease in the thickness of the spermatogenic epithelium by 30 days after dark deprivation and a decrease in the level of the Klotho protein, which is a marker of premature aging. The introduction of exogenous melatonin had a protective effect on the morphological and functional status of the testes of animals, accompanied by the restoration of the spermatogenic epithelium, an increase in the Klotho protein to the level of the negative control group.

Keywords: testes, premature aging, dark deprivation, stress, melatonin, Klotho protein

С каждым годом в России и в мире в целом отмечается рост частоты мужского бесплодия, одной из причин которого является световое загрязнение.

Темновая депривация оказывает негативное влияние на репродуктивное здоровье населения, в том числе на дифференцировку мужских половых клеток, приводя

к преждевременному старению и мужскому бесплодию [2, 4]. Одним из факторов, приводящий к развитию морфофункциональных нарушений органов мужской репродуктивной системы на фоне темновой депривации является дефицит выработки мелатонина. Это приводит к уменьшению количества вырабатываемых сперматозоидов и их качества, изменения уровня мужских половых гормонов, что оказывает прямое влияние на фертильность. Ускоренное старение, вызванное световым десинхронизмом, воздействует на мужскую фертильность целым рядом факторов, которые в настоящее время до конца не изучены [1, 3]. Эти факты указывают на необходимость проведения дополнительных исследований для выяснения причин репродуктивных отклонений, изучения механизмов и поиска профилактических средств коррекции.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявить морфологические изменения семенников у крыс при преждевременном старении, вызванном темновой депривацией.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 49 беспородных белых крысах самцах в возрасте 4 мес. Эксперименты проводили в соответствии с правилами лабораторной практики РФ (ГОСТ 33044-2014). Животные содержались по 5 особей в клетке (PP-4 клетка для лабораторных крыс, 466 × 314 × 200 мм; Fengshi, Китай) в стандартных лабораторных условиях при 22–24 °C и относительной влажности воздуха 40–50 %. Все процедуры с животными проводились в соответствии требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010.

Были сформированы 3 группы животных: 1) контрольная группа крыс, которые не подвергались темновой депривации – негативный контроль ($n = 24$); 2) контрольная группа животных, которые подвергались темновой депривации – позитивный контроль ($n = 26$); 3) опытная группа животных, которые после темновой депривации получали лечебный курс мелатонина ($n = 16$).

Ускоренное старение в опытной группе и позитивного контроля моделировали путем 30-дневной темновой депривации в условиях постоянного искусственного освещения (300 Люкс). Животные группы негативного контроля находились при 12-часовом искусственном свето-темновом освещении. По окончании 30-дневной темновой депривации животные опытной группы ежедневно в одно и то же время (20:00 МСК) перорально (внутрижелудочно через зонд) получали мелатонин в течение 14 суток. Животные

позитивного и негативного контроля получали в течение 14 суток 2%-ю крахмальную слизь в эквивалентном объеме.

С целью забора крови животных для определения содержания в сыворотке мелатонина и белка Клото наркотизировали путем однократного внутрибрюшинного введения хлоралгидрата (400 мг/кг) в воде очищенной в объеме 10 мл/кг. Забор крови осуществляли из брюшной аорты крыс. После забора крови животных подвергали эвтаназии декапитацией с помощью гильотины (ООО «Открытая наука», Москва, Россия). Для стабилизации крови использовали 3,8%-й водный раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Для исследования уровня мелатонина и белка Клото получали сыворотку крови путем центрифугирования при 3000 об./мин в течение 20 мин. Аликвоты сыворотки крови замораживали и хранили при температуре –20 °C.

С помощью твердофазного иммуноферментного анализа проводилось определение в сыворотке крови концентрации мелатонина и белка Клото. Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора реактивов ELISA Kit for Klotho (KL) производства CLOUD-CLONE CORP. (США) на автоматическом микропланшетном фотометре Sunrise TS4TECAN (Tecan Austria GmbH, Австрия).

Для исследования морфологического состояния репродуктивной системы самцов крыс производили забор семенников. Ткань семенников помещали в 10%-й забуференный формалин с последующей автоматизированной гистологической проводкой (Leica TP1020) и окраской гематоксилином и эозином.

Микрофотосъемка гистологических микропрепаратов проводилась с помощью микроскопа Leica DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программного комплекса LAS v.4.7. В каждом поле зрения измерялась толщина сперматогенного эпителия, площадь извитых семенных канальцев, площадь интерстициальной соединительной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием рангового однофакторного дисперсионного анализа Краскела – Уоллиса с апостериорным критерием Данна при помощи программы GraphPad Prism 8.0. Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро – Уилка. Статистически значимыми расценивались изменения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании препаратов семенников крыс, подвергнутых воздействию темновой депривации, выявлены морфологические изменения,

характеризующиеся изменением паренхимы и стромы семенников в отличие от группы негативного контроля (рис. А). Так, со стороны эпителия извитых семенных канальцев наблюдалась десквамация клеток сперматогенного эпителия, затрагивающего популяции сперматоцитов I и II порядков, что сопровождалось уменьшением толщины сперматогенного эпителия на 26,3 % ($p < 0,001$). Сперматоциты I порядка располагались неравномерно, сохраняя свои морфологические характеристики и прилежали к сперматогониям, которые, в свою очередь, находились непосредственно у базальной мембраны канальцев при наличии пространства между слоем клеток за счет выраженного отека (рис. Б). Следует отметить, что сперматоциты II порядка наблюдались не во всех канальцах и заметно снижалось их количество, что свидетельствует о гипотрофии, а в отдельных случаях и атрофии сперматогенного эпителия. Единичные сперматиды в просвете канальца соответствовали расположению пирамидных клеток Сертоли, где их популяция сохраняла свою численность и расположение. Наряду с этим, наблюдался отек как со стороны сперматогенного эпителия, так и со стороны интерстициальной ткани, где просматривались оптически пустые пространства различной степени выраженности. Сосуды микроциркуляторного русла имели выраженное полнокровие.

При морфометрическом анализе наблюдалось уменьшение площади извитых семенных канальцев на 1,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с показателем крыс групп негативного контроля, что подтверждалось

повышением соотношения площади интерстициальной ткани и извитых семенных канальцев на 26,7 % ($p < 0,01$). Отмечалось снижение индекса сперматогенеза на 6,25 % по сравнению с группой негативного контроля.

При морфологическом анализе семенников крыс, получавших мелатонин, выявлено, что половые клетки в извитом семенном канальце расположены в соответствии со стадиями сперматогенеза. В данном случае просматривались все клеточные популяции сперматогенного эпителия, где у базальной мембраны располагались мелкие округлые гиперхромные клетки (сперматогонии) с незначительными признаками отека, проявляющегося в наличии пространств между базальной мембраной и сперматогенным эпителием (рис. В). Сохранялась стратификация эпителия в формировании слоев сперматоцитов I и II порядков, наблюдалось восстановление толщины сперматогенного эпителия с ее увеличением на 26,6 % ($p < 0,001$) по сравнению с группой негативного контроля, а также повышение индекса сперматогенеза на 3 %. Клетки Сертоли имели пирамидную форму и прилежали к базальной мембране, сохраняя свою связь со сперматидами, которые частично определялись в просвете канальца. При оценке площади извитых семенных канальцев было установлено, что она увеличилась на 1,5 % ($p < 0,05$). Наряду с этим, наблюдалось уменьшение соотношения площади интерстициальной ткани и извитых семенных канальцев на 18,6 % ($p < 0,01$).

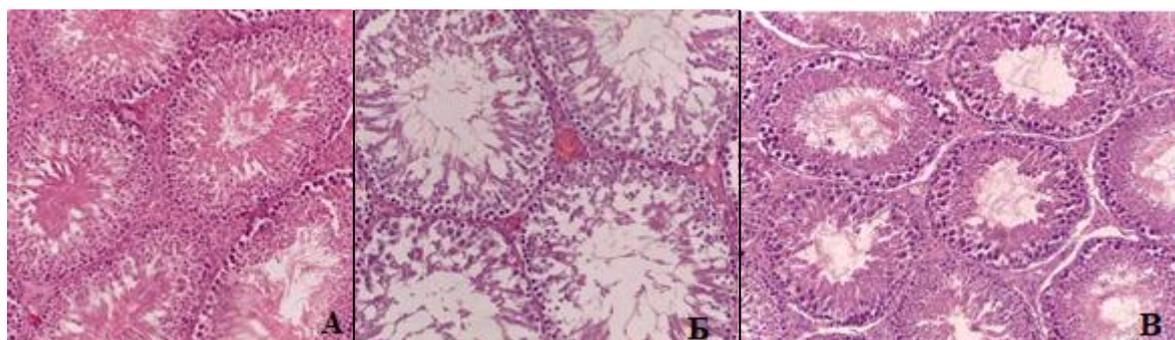


Рис. Срез семенника крысы. А – негативный контроль, Б – позитивный контроль, В – опытная группа.
Окраска: гематоксилин и эозин. Ув. $\times 20$

Морфологические изменения в семенниках крыс в условиях темновой депривации свидетельствуют о преждевременном старении, что также подтверждается снижением уровня белка Клото у животных позитивного контроля по отношению к уровню негативного контроля в 1,7 раза. Однако полного восстановления уровня белка Клото в крови у опытных

животных, получавших мелатонин, не наблюдалось, значение данного показателя было у них статистически не значимо меньше, чем у крыс негативного контроля в 1,36 раза. Снижение показателя соотношения площади интерстициальной ткани и извитых семенных канальцев свидетельствует о восстановлении уровня активности сперматогенеза.

Таким образом, темновая депривация в течение 30 сут., используемая как одна из наиболее адекватных моделей преждевременного старения репродуктивной системы, приводит к статистически значимым гистоморфологическим изменениям в структуре семенников – уменьшению площади извитых семенных канальцев, истончению сперматогенного эпителия и истощению популяций половых клеток, что может свидетельствовать об угнетении сперматогенеза.

Введение экзогенного мелатонина, 14-суточным курсом, создает необходимые условия для ремоделирования сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев, восстановления численности мужских половых клеток и увеличения площади извитых семенных канальцев. Однако необходимо более детальное изучение популяций половых клеток. Старение мужской репродуктивной системы характеризуется снижением функций яичек и надпочечников и приводит к снижению концентрации андрогенов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, темновая депривация оказывает негативное влияние на морфофункциональное состояние репродуктивной системы самцов крыс, проявляющееся нарушениями сперматогенеза в семенниках крыс, снижением уровня белка Клото. Введение мелатонина экспериментальным животным приводит к коррекции нарушений генеративной функции семенников, увеличению уровня белка Клото. Полученные данные об особенностях гистологического строения семенников при воздействии 30-суточной темновой депривации и последующей коррекции мелатонином расширяют имеющиеся представления о причинах, вызывающих нарушения сперматогенеза и его регуляции. Прием мелатонина в течение 14 сут. способствует

восстановлению сперматогенного эпителия, увеличению белка Клото в сыворотке крови животных, что указывает на протективное действие мелатонина на морфофункциональное состояние животных после 30-суточной темновой депривации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Elliott S.P. Impact of Sleep Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Erectile Tissue // *The Journal of urology*. 2020. Vol. 204 (5). P. 1088–1089.
2. Potential Effect of the Circadian Clock on Erectile Dysfunction / T. Li, Y. Bai, Y. Jiang [et al.] // *Aging and disease*. 2022. Vol. 13 (1). P. 8–23.
3. Морфологическая оценка функциональных изменений семенников под влиянием светового десинхроноза в эксперименте / О.В. Злобина, И.О. Бугаева, С.С. Пахомий [и др.] // *Вестник новых медицинских технологий*. 2018. Т. 12, № 5. С. 250–254.
4. Lee D.S., Choi J.B., Sohn D.W. Impact of Sleep Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Erectile Tissue // *The journal of sexual medicine*. 2019. Vol. 16 (1). P. 5–16.

REFERENCES

1. Elliott S. P. Impact of Sleep Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Erectile Tissue. *The Journal of urology*. 2020;204(5):1088–1089.
2. Li T., Bai Y., Jiang Y. et al. Potential Effect of the Circadian Clock on Erectile Dysfunction. *Aging and disease*. 2022;13(1):8–23.
3. Zlobina O.V., Bugaeva I.O., Pakhomiy S.S. et al. Morphological assessment of functional changes in the testes under the influence of light desynchronization in the experiment. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Bulletin of new medical technologies*. 2018;12(5):250–254. (In Russ.)
4. Lee D.S., Choi J.B., Sohn D.W. Impact of Sleep Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Erectile Tissue. *The journal of sexual medicine*. 2019;16(1):5–16.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Лариса Игоревна Кондакова – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9028-2993>, larisakondakova@gmail.com

Светлана Александровна Калашникова – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7688-9366>, kalashnikova-sa@yandex.ru

Людмила Викторовна Полякова – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-5349-1435>, lvpolyakova7@gmail.com

Михаил Владимирович Букатин – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <http://orchid.org/0000-0003-1031-0697>, buspak76@mail.ru

Статья поступила в редакцию 09.09.2022; одобрена после рецензирования 21.10.2022; принята к публикации 06.12.2022.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

Larisa I. Kondakova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9028-2993>, larisakondakova@gmail.com

Svetlana A. Kalashnikova – Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Anatomy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7688-9366>, kalashnikova-sa@yandex.ru

Ludmila V. Polyakova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <http://orchid.org/0000-0002-5349-1435>, lvpolyakova7@gmail.com

Mikhail V. Bukatin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Fundamental Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <http://orchid.org/0000-0003-1031-0697>, buspak76@mail.ru

The article was submitted 09.09.2022; approved after reviewing 21.10.2022; accepted for publication 06.12.2022.