

КОРРЕКЦИЯ ПОСТИШЕМИЧЕСКИХ РЕПЕРФУЗИОННЫХ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

ШЕВАНТАЕВА О.Н.

ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Росздрава», г. Нижний Новгород

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, сперматогенез, актовегин, мексидол.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения больных, перенесших терминальные состояния, в генезе которых, помимо гипоксии, существенную роль играют процессы нарушения утилизации кислорода, реперфузии и реоксигенации, представляется чрезвычайно сложной и далеко еще не решенной. В последнее время идет активный поиск новых средств и методов интенсивной терапии гипоксических состояний. Среди различных методов коррекции наибольший интерес вызывает фармакологическая защита от повреждающего воздействия гипоксии с использованием препаратов направленного метаболического действия, обладающих антигипоксическим эффектом. К таким препаратам относятся, в частности, актовегин и мексидол.

Положительный эффект широкого применения актовегина и мексидола в клинической практике при гипоксических повреждениях сердца, мозга, печени [1, 2, 3] дает основание полагать, что эти препараты могут быть также эффективно использованы для коррекции повреждений сперматогенного эпителия после ишемических воздействий. Однако на сегодняшний день сведения о подобных исследованиях в литературе практически отсутствуют.

Целью нашего исследования явилось изучение состояния сперматогенеза, механизмов его нарушения после моделирования клинической смерти и оценка эффективности защитного действия антигипоксантов метаболического типа в раннем постреанимационном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 219 самцах белых беспородных крыс массой 180-230 г. Содержание животных и все эксперименты проведены в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

У наркотизированных животных (этаминал-натрий 25 мг/кг, внутривенно) 10-минутную тотальную ишемию моделировали путем полного пережатия сердечно-сосудистого пучка, после чего осуществляли непрямой массаж сердца и искусственную вентиляцию легких до восстановления собственного дыхания и сердечной деятельности [4].

В I группе (63 животных) не использовали антигипоксанты, во II группе (63 животных) в раннем реперфузионном периоде однократно внутривенно вводили актовегин в дозе 10 мг/кг, в III группе (63 животных) вводили мексидол в дозе 50 мг/кг. Общим контролем служили интактные животные (30), у которых на протяжении периода наблюдения оценивали те же показатели, что и в опытных группах в сроки 40 мин, 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60 сутки.

Для оценки состояния сперматогенеза использовали количественный цитологический метод [5], который заключается в приготовлении мазков из клеточной суспензии ткани семенников и окрашивании их по Романовскому-Гимзе. В условиях световой микроскопии с использованием масляной иммерсии производили идентификацию и подсчет отдельных типов клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига общим количеством 500 и составляли спермограмму – процентное соотношение различных типов клеток тестикул. Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия в 1 г тестикулярной ткани вычисляли путем составления математических пропорций, используя абсолютное число сперматозоидов, подсчет которых проводился в камере Горяева.

Определение уровня лактата и пирувата в ткани семенника проводили энзиматическим методом с использованием лактатдегидрогеназы [6]. О количестве лактата судили по уровню образовавшегося восстановленного никотинамид-адениндинуклеотида, о количестве пирувата – по убыли НАДН, регистрируемого на спектрофотометре при длине волны 340 нм. Содержание лактата и пирувата выражали в мкмоль/г ткани. Наличие свободных радикалов в ткани тестикул определяли методом хемилюминесценции [7]. Метод основан на том, что в системе пероксида водорода и сульфата железа происходит каталитическое разложение H_2O_2 ионами металла с переменной валентностью – двухвалентным железом (Реакция Фэнтона). Образующиеся свободные радикалы вступают в реакцию активации свободнорадикального окисления в биологическом субстрате, что приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света, регистрируемого на приборе БХЛ-06. Информационными показателями считаются I_{max} – максимальная интенсивность свечения исследуемой пробы, измеряемая в mV, отражающая свободнорадикальную активность образца и светосумма хемилюминесценции за определенное время (S), которая отражает общую активность антиоксидантных систем защиты.

Полученные данные были обработаны с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенность модели клинической смерти заключается в прекращении доставки к органам не только кислорода, но и субстратов окисления [8]. Развитие патофизиологических изменений в клетках ишемизированного органа не ограничивается периодом ишемии. Структурные и функциональные расстройства прогрессируют и после восстановления кровотока. Реперфузия, являясь необходимым условием

восстановления жизнеспособности органа, влечет за собой и негативные последствия, приводя к развитию вторичной гипоксии и активации свободнорадикального окисления [9].

Наши исследования показали, что через сутки после полного пережатия сердечно-сосудистого пучка наблюдается резкое снижение количества всех типов клеток сперматогенного эпителия. Наиболее существенные изменения отмечались на 7-14 сутки, когда в спермограмме крыс количество ранних сперматид упало до нуля. С 21 суток эксперимента наметилась тенденция к активации сперматогенеза, что связано с началом новой стадии цикла развития клеток сперматогенного эпителия [10]. Однако и к 60 суткам количество клеток сперматогенного эпителия оставалось достоверно ниже нормы (рис. 1).

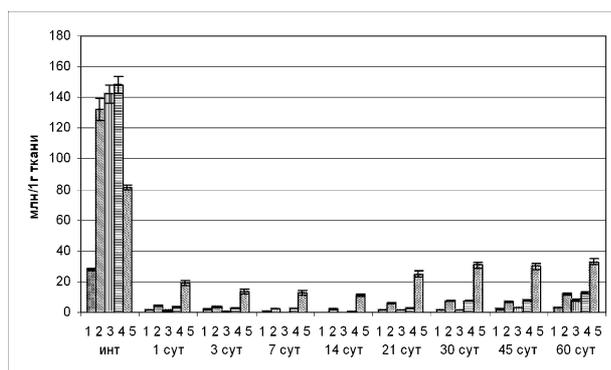


Рис. 1. Количество клеток сперматогенного эпителия после моделирования клинической смерти, $p < 0,05$:

1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды ранние; 4 – сперматиды поздние; 5 – сперматозоиды.

Также значительно снижалось количество клеток Сертоли и Лейдига. Абсолютное число клеток Сертоли к 14 суткам снизилось в 40 раз. В сроки 21-60 сутки отмечено некоторое увеличение количества клеток Сертоли, однако их число было существенно ниже, чем у интактных животных.

На 1 сутки реперфузионного периода наблюдалось двадцатикратное уменьшение количества клеток Лейдига. На 7, 14, 21 и 30 сутки экспериментальной клетки Лейдига в ткани тестикул отсутствовали. На 45 суток в спермограмме крыс вновь появились клетки Лейдига, и к 60 суткам их количество в среднем составило только $0,4 \pm 0,1$ млн (в контроле – $8,1 \pm 0,9$ млн).

С целью изучения механизмов изменений клеточного состава тестикул были проведены биохимические исследования активности свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы, а также содержания продуктов гликолиза в ткани семенников.

Наши исследования показали, что активность свободнорадикального окисления на 40 минуте реперфузионного периода была в 2 раза выше, чем у интактных животных. При этом отмечен и более низкий уровень антиоксидантной защиты.

Известно, что для ткани семенников характерна высокая активность гликолитических процессов. Лактат, пируват и глюкоза служат энергетическими субстратами для созревающих половых клеток [11]. Было показано, что жидкость семенных канальцев

содержит больше лактата, чем глюкозы и пирувата [12]. Поступающая в семенник глюкоза утилизируется в ходе гликолиза в клетках Сертоли и превращается в лактат, который секретируется в просвет семенных канальцев [13]. Лактат оказывает стабилизирующее влияние на мембраны герминативных клеток и подавляет процессы апоптоза, независимо от уровня адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ) в тестикулах [14].

После моделирования клинической смерти уже на 40 минуте реперфузионного периода в ткани тестикул имело место уменьшение уровня лактата на 85%, а пирувата на 31%, что свидетельствовало о снижении интенсивности процессов гликолиза. В последующие сроки наблюдения отмечался значительный рост концентрации пирувата. Увеличение уровня пирувата в ткани тестикул, возможно, связано, во-первых, с нарушением его превращения в ацетил-СоА и в лактат в условиях нарушенного тканевого дыхания в постишемическом периоде [8]; во-вторых, со снижением числа сперматоцитов и сперматид, которые используют пируват в качестве энергетического субстрата [13].

Таким образом, можно полагать, что активация свободнорадикального окисления и истощение антиоксидантной защиты, низкая концентрация лактата в ткани семенников на 40 минуте реперфузионного периода явились факторами гибели герминативных клеток, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига в наших экспериментах. Вместе с тем снижение количества клеток Сертоли и клеток Лейдига тормозило восстановление сперматогенеза в более поздние сроки. Известно, что клетки Сертоли оказывают влияние на гаметогенез путем метаболического обеспечения клеток сперматогенного эпителия; участвуют в поддержании целостности гематотестикулярного барьера и обеспечивают сохранение в канальцах семенников среды, богатой калием и бикарбонатом, которая необходима для осуществления мейоза и завершения развития сперматозоидов [15]. Клетки Лейдига являются основными продуцентами тестостерона, недостаток которого приводит к подавлению мейотического деления сперматоцитов и нарушению их превращения в сперматиды [16].

В настоящее время остается актуальным изучение эффективности применения антигипоксантов метаболического типа действия в раннем реперфузионном периоде. Препараты этого класса нормализуют энергетический обмен в условиях гипоксии. Большинство из них проявляют свойства антиоксидантов, что усиливает их антигипоксический эффект.

Поставленные нами серии экспериментов с применением актовегина и мексидола в раннем постишемическом периоде показали высокую эффективность этих препаратов для предупреждения постишемических нарушений сперматогенеза.

Следует подчеркнуть, что наиболее выраженное положительное действие на сперматогенез оказывает актовегин. Так, у животных, которым после моделирования клинической смерти в раннем постреанимационном периоде однократно вводили актовегин, происходило полное восстановление сперматогенеза на 45 сутки наблюдения (рис. 2).

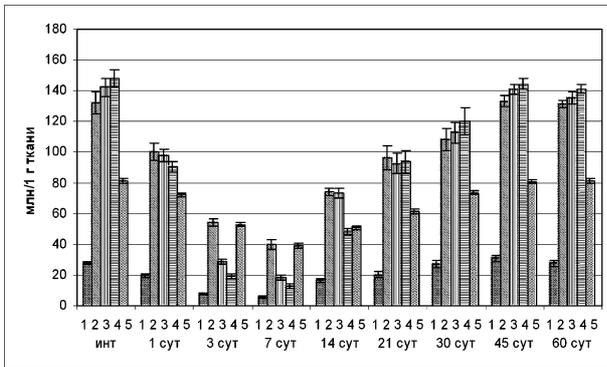


Рис. 2. Количество клеток сперматогенного эпителия после моделирования клинической смерти и введения актовегина, $p < 0,05$:

1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды ранние; 4 – сперматиды поздние; 5 – сперматозоиды.

Тогда как применение мексидола было менее эффективным и не приводило к полному восстановлению количества клеток сперматогенного эпителия к 60 суткам эксперимента (рис. 3).

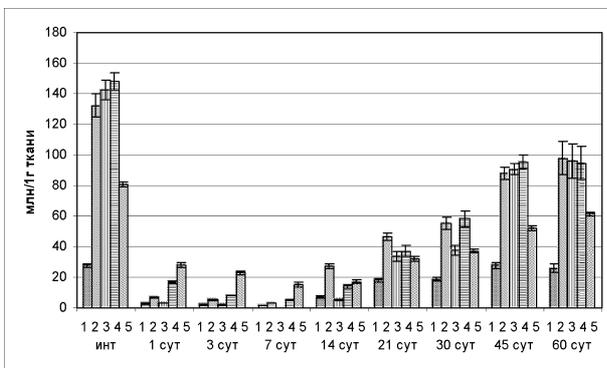


Рис. 3. Количество клеток сперматогенного эпителия после моделирования клинической смерти и введения мексидола, $p < 0,05$:

1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды ранние; 4 – сперматиды поздние; 5 – сперматозоиды.

Эти различия, вероятно, обусловлены особенностями фармакологического действия исследуемых препаратов. Как показали наши эксперименты, применение актовегина и мексидола в раннем постреанимационном периоде сопровождалось снижением уровня свободнорадикального окисления в тканях тестикул. Причем, мексидол на 40 минуте реперфузионного периода вызывал более значительное снижение уровня свободных радикалов, чем актовегин. Так, в группе животных с введением мексидола общая активность свободнорадикального окисления составила $2,50 \pm 0,14$ мВ (у животных без препарата – $3,44 \pm 0,18$ мВ), а в группе животных с введением актовегина – $3,09 \pm 0,08$ мВ. Таким образом, по сравнению с актовегином, мексидол обладает выраженным антиоксидантным действием, что, по нашему мнению, обеспечивает большую сохранность клеточного состава семенников в раннем постреанимационном периоде и тем самым способствует более быстрому началу восстановительных процессов, чем в группе животных без препаратов. Однако, несмотря на это, уменьшение количества клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига было более значительным в группе животных с применением мексидола, чем актовегина.

При исследовании содержания продуктов гликолитического обмена мы обнаружили, что при использовании мексидола содержание лактата в ткани тестикула на 40 минуте реперфузионного периода было в 2 раза ниже, чем при введении актовегина. Более высокий уровень лактата в группе животных с актовегином, по нашему мнению, явился основным фактором, который предохранял клетки от повреждения в раннем постишемическом периоде, что в дальнейшем и приводило к достаточно быстрому их количественному восстановлению.

Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что 10-минутная тотальная ишемия и последующая реанимация приводят к выраженным и длительным нарушениям сперматогенеза, которые проявляются уменьшением числа всех клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига в ткани тестикул. Установлено, что применение актовегина в раннем постреанимационном периоде способствует более быстрому восстановлению сперматогенеза, чем использование мексидола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Столярова В.В. Исследование кардиопротекторного действия препаратов с антиоксидантной активностью при острой ишемии головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2001. – № 6. – С. 31-33.
2. Бояринов Г.А., Пенкович А.А., Мухина И.В. Метаболические эффекты нейротропного действия актовегина в условиях гипоксии // Актовегин. Новые аспекты клинического применения. – М., 2002. – С. 10-14.
3. Врублевский О.П., Кузнецов В.Н., Алексеева Г.В. и др. Актовегин в реаниматологии // Актовегин. Новые аспекты применения в клинической практике. – М., 1995. – С. 42-52.
4. Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1982. – № 3. – С. 78-80.
5. Иванов Ю.В. Цитологические критерии состояния сперматогенеза в токсико-гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария. – 1986. – № 4. – С. 52-55.
6. Асантин В.С. Новые методы биохимической фотометрии. – М.: Наука, 1965. – 54 с.
7. Андреева Н.Н. Состояние липидного обмена жизненно важных органов в постреперфузионном периоде и его модификация антигипоксантами. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Н.Новгород, 2007. – 48 с.
8. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения, лечения). – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
9. Литвицкий П.Ф., Сандриков В.А., Демуров Е.А. Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда. – М.: Медицина, 1994. – 320 с.
10. Franca L.R., Ogawab T., Avarockb M.R. et. al. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat // Biology of Reproduction. – 1998. – Vol. 59. – P. 1371-1377.
11. Nakamura M., Okinaga S., Arai K. Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testes: pyruvate maintenance of adenosine triphosphate level // Biology of Reproduction. – 1984. – Vol. 30. – P. 1187-1197.
12. Evan R.W., Setchell B.P. The effect of rate testis fluid on the metabolism of testicular spermatozoa // Journal of Reproduction and Fertility. – 1978. – Vol. 52. – P. 15-19.
13. Robinson R., Fritz I.B. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture // Biol. Reprod. – 1981. – Vol. 24. – P. 1032-1041.
14. Erkkila K., Aito H., Aalto K. et. al. Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis // Molecular Human Reproduction. – 2002. – Vol. 8, № 2. – P. 109-117.
15. Пшеничникова Т.Я. Бесплодие в браке. – М.: Медицина, 1991. – 317 с.
16. Резников, А.Г., Варага С.В. Антиандрогены. – М.: Медицина, 1988. – 208 с.

РЕЗЮМЕ

Проведено экспериментальное исследование влияния антигипоксикантов на последствия реперфузионных нарушений в ткани семенников после 10-минутной клинической смерти. Показано, что сперматогенез быстрее восстанавливается после применения актовегина, чем мексидола. Цитопротекторное действие актовегина связано с уменьшением уровня свободных радикалов и увеличением уровня лактата в ткани тестикул в раннем постреанимационном периоде.

ABSTRACT:

The experimental study of an effect of antihypoxic agents on aftermaths of reperfusion alterations in testicular tissues following 10-minutes clinical death has been performed. It has been demonstrated that spermatogenesis recovery took lesser time after Actovegin administration than after Mexidolom administration. The cytoprotective action of Actovegin is due to decrease of free radicals level and elevation of lactate level in testicular tissue during early post-reanimation period.

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ НА ДИНАМИКУ ГИСТАМИНА КОЖИ В ОБЛАСТИ АКУПУНКТУРНЫХ ТОЧЕК

ГУРЬЯНОВА Е.А., ЛЮБОВЦЕВА Л.А., ЛЮБОВЦЕВА Е.В., ЛЮБОВЦЕВ В.Б.

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

АННОТАЦИЯ

Авторами изучены люминесцентно-гистохимические характеристики гистаминсодержащих структур кожи в области точек акупунктуры после лазеропунктуры. Проведенный спектрофлуориметрический анализ методами люминесцентной микроскопии позволил выявить особенности изменений гистаминного статуса кожи различных точек акупунктуры в разные сроки после воздействия.

Ключевые слова: гистамин, лазеропунктура, точки акупунктуры, тучные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Основываясь на современных данных биологии, морфологии, нейроиммуноэндокринологии, была предложена принципиальная схема формирования локального регуляторного континуума (РК) на уровне рефлексогенных зон кожи. Одним из основных элементов локального РК является каскад реакций с участием биогенных аминов, в том числе гистамина. В формировании генерального РК важная роль отводится соединительной ткани, которая обеспечивает сопряжение нервных, эндокринных и иммунных механизмов в интегральном ответе организма на любые внешние воздействия, в том числе и на лазеропунктуру (ЛП) [1, 2]. В этом плане интересен вопрос ранних изменений в биоаминном обеспечении кожных структур в области точки акупунктуры (ТА), возникающих при лазеропунктуре. Лазеропунктура является одним из актуальных методов лечения в современной восстановительной медицине. Данный метод воздействия характеризуется высокой клинической эффективностью, неинвазивностью, быстротой, безболезненностью и асептичностью.

Целью настоящего исследования является выявление динамики содержания гистамина в коже крыс в области различных ТА при воздействии лазеропунктурой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы половозрелые самцы белых беспородных крыс, которым проводили лазеропунктуру низкоинтенсивным лазерным аппаратом «Креолка». ЛП проводилась в симметричные ТА меридиана толстого кишечника LI 11 (N^o=10), в ТА GV 14 заднесрединного меридиана (N^o=10), а также в зоны, находящиеся рядом с ТА (N^o=5), в течение 30'' и 90'' (N^o=10), что соответствует возбуждающему и тормозному методам воздействия. Обе точки обладают высокой клинической эффективностью [3]. Кусочки кожи размером 0,5 см² после определения локализации ТА с помощью прибора «Элитерис» бра-

ли в зонах ТА, ЛП проводили после предварительной маркировки. Исследуемый материал извлекали в глубокой стадии эфирного наркоза через 15 мин., через час и через сутки после процедуры. Криостатные срезы обрабатывали люминесцентно-гистохимическим методом Кросса [4]. Полученные препараты рассматривали под люминесцентным микроскопом ЛЮМАМ-4. Метод спектрофлуориметрии использовали для количественного выражения уровня гистамина в тканевых структурах кожи. Показания снимали с табло усилителя в условных единицах. Статистическую обработку данных проводили с помощью персонального компьютера «Pentium» с использованием стандартного пакета программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В предыдущих исследованиях было показано, что морфологическим субстратом, создающим биоаминное обеспечение кожи крыс в области как ТА, так и близлежащих участков, являются эпителий, тучные клетки (ТК), волосяные фолликулы, эластические волокна сетчатого слоя, ядра фибробластов [5]. Цитоспектрофлуориметрия срезов кожи крыс в области исследованных ТА показала, что среди вышеперечисленных структур кожи наибольшее содержание гистамина демонстрируют ТК гиподермы и эластические волокна сетчатого слоя дермы, несколько меньше – эпителий, еще меньше – фибробласты сосочкового слоя дермы и гиподерма.

Так, в эпителии ТА LI 11 исходно уровень Г составлял 12,7±0,6 у.е., в фибробластах сосочкового слоя – 7,9±0,3 у.е., в эластических волокнах сетчатого слоя дермы – 16,8±0,4 у.е., в гиподерме – 8±0,4 у.е., в ТК гиподермы – 17±0,8 у.е. (табл. 1). Следует отметить, что исходное содержание гистамина в структурах кожи в области дорзальной ТА GV 14 было достоверно выше, чем в дистальной ТА LI 11. Срезы кожи вне ТА характеризовались меньшим содержанием исследуемого трансмиттера в эпителии, эластических волокнах по сравнению с уровнем Г в ТА (p < 0,05).

Было установлено, что ЛП не вызывает визуальных изменений люминесцентной картины кожи. Однако на фоне ЛП содержание Г в структурах кожи в области ТА LI 11 повысилось, причем в эпителии, сосочковом слое и гиподерме статистически достоверно, p<0,05.

Исследования продемонстрировали, что динамика повышения содержания Г в структурах кожи ТА LI 11 в ответ на 30'' воздействие лазером была различной. Так, в эпителии, фибробластах сосочкового слоя произошло увеличение содержания Г в 1,34 и 1,39 раза соответственно (p<0,05), в ТК – в 1,28 раза, а более всего в гиподерме – в 1,5 раза (p<0,05).