

Дослідження субмікроскопічної архітектоніки клітин Сертолі й Лейдіга після впливу гідрохлориду серотоніну та можливості корекції метаболічними засобами

Н.М. Бречка, В.П. Невзоров *, В.А. Бондаренко, Н.Г. Малова, Н.Ю. Селюкова

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків;

*ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України», Харків;

E-mail: natalia_iper@mail.ru

Представлено результати дослідження ультраструктурних змін органел клітин Сертолі і Лейдіга, після дії гідрохлориду серотоніну та введення біоглобіну-У. Показано, що гідрохлорид серотоніну викликає на внутрішньоклітинному рівні мітохондріальну дисфункцію і активує катаболічні внутрішньоклітинні процеси, а препарат біоглобін-У на його тлі підвищує активність репаративних і синтетичних реакцій, знижує ступінь мітохондріальної дисфункції і катаболічних процесів, а також активує метаболізм клітин Лейдіга, і значно знижує кількість вогнищ деструкції мембран ендоплазматичного ретикулула, мембран ядра і мітохондрії.

Ключові слова: ультраструктура клітин Сертолі і Лейдіга; серотоніну гідрохлорид; мітохондріальна дисфункція; біоглобін-У

ВСТУП

Проблема чоловічого безпліддя, що розвивається внаслідок захворювань або всіх сумарних патологічних впливів на репродуктивну систему чоловіків, досить актуальна нині усьому світі. Його патогенез, структура, діагностика - це предмет багатьох дискусій [1–4]. Статистика ВООЗ надає інформацію про те, що в 45 % випадків безплідних пар «винуватцем» є чоловік, а в 40 % - жінка [5]. Різноманіття факторів, що призводять до чоловічого безпліддя та можливість їх поєднання ускладнюють вибір необхідних методів діагностики і особливо лікування. Відомо, що серед багатьох причин чоловічої неплідності провідною є варикоцеле простатити різного генезу, травми статевих органів, тощо. При цьому відновлення репродуктивної функції розтягується за часом і негативно позначається на ефективності лікування [6–8]. У зв'язку з цим розуміння механізмів ефекту тих чи інших факторів

залежить від правильного вибору лікарської терапії. Спермії розвиваються в звивистих каналцях, що встелені клітинами Сертолі і герміногенними клітинами. Головною функцією клітин Сертолі є забезпечення розвитку сперматозоїдів, формування гематотестикулярного бар'єра за рахунок щільних з'єднань між собою [9, 10]. Таким чином, для нормального сперматогенезу необхідна комплексна взаємодія клітин Сертолі і Лейдіга [10]. Порушення функціонального стану всіх цих клітин може негативно позначитися на перебіг сперматогенезу. Важливим є дослідження негативного впливу різних факторів на функцію сім'яників [11]. Для відтворення патології гонад нами була використана модель серотонінового ураження яєчок. У механізмі розвитку цієї патології провідну роль відіграє судиннозвужувальна дія гідрохлориду серотоніну, з подальшим порушенням трофіки та виникненням патологічних змін у органі, що часто зустрічається в практиці лікарів (варикоцеле, травми, процеси, які

© Н.М. Бречка, В.П. Невзоров, В.А. Бондаренко, Н.Г. Малова, Н.Ю. Селюкова

ISSN 0201-8489 Фізіол. журн., 2015, Т. 61, № 4

викликані гіподинамією, тощо) [11]. Гідрохлорид серотоніну в дозі 5 мг/кг порушує метаболізм підтримуючих епітеліоцитів і інтерстиціальних ендокриноцитів сім'яників щурів. Різко знижувалася синтетична і репаративна активність, структурним підтвердженням чого є фрагментація мембран ендоплазматичного ретикулума, зменшення числа рибосом, полісом і секреторних гранул, збільшення кількості вторинних лізосом, а також редукція пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі [11].

Нині ведеться пошук препаратів, що поліпшують стан репродуктивної системи після деструктивного впливу [12]. В останні роки досить актуальним є застосування препаратів біогенних стимуляторів (муміє, прополіс, екстракт алое). Основна їх особливість полягає в тому, що вони активують різні захисні системи організму, головним чином, ферментні, імунобіологічну реактивність, нормалізують гормональні функції і т.д. Завдяки індукції, репресії, інгібуванню та підвищенню каталітичної активності різних ферментів вони стимулюють загальний метаболізм організму, чим і пояснюється широта діапазону їх дії [13, 14]. Таким препаратом є біоглобін-У – протеїнізований водно-сольовий екстракт плаценти людини, до складу якого входять поліпептиди (3,5-7 %), амінокислоти (50-60 %), аміноцукри (4-5 %), гексуронові кислоти (8-9 %) [15]. Відомо, що його застосування при гострому та хронічному простатиті перешкоджає дегрануляції тканинних базофілів [16].

Метою нашої роботи було дослідження субмікроскопічної архітекtonіки клітин Сертолі і Лейдіга, які зазнали деструктивного впливу гідрохлориду серотоніну та можливості корекції цього стану препаратом біоглобін-У.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на білих статевозрілих самцях щурів популяції Вістар з масою

тіла 280-350 г. Тварини були розподілені на три групи: 1-ша – негативний контроль (інтактні щури), 2-га – позитивний контроль (контрольна патологія – тварини з модельованим серотоніновим ураженням яєчок [9]), 3-тя – тварини, яким за 3 доби до початку введення гідрохлориду серотоніну, на тлі його введення та протягом 3 діб після ін'єкцій гідрохлориду серотоніну вводили препарат біоглобін-У (виробництва компанії ЗАТ «Біолік», м. Харків) у дозі 200 мкл/кг. Гідрохлорид серотоніну (Alfa Aesar®, США) вводили протягом 14 діб підшкірно у дозі 5 мг/кг [17].

Тварин декапітували на 21-шу добу відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [18].

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки тканини сім'яника піддавали попередній фіксації в 2,5%-му забуференому розчині глутарового альдегіду протягом 5-6 год при 4°C. Після цього промивали в буферному розчині, остаточну фіксацію проводили в 1%-му забуференому розчині чотириокису осмію. Зневоднення тканини проводили в спиртах зростаючої концентрації й ацетоні. Потім тканину просочували в суміші епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками [19, 20]. Блоки полімеризували в термостаті при 60°C протягом 48 год. З них на ультрамикротомі УМТП-3М виготовляли ультратонкі зрізи, монтували їх на електролітичні сіточки і, після контрастування цитратом свинцю, вивчали під електронним мікроскопом ЕМВ-100БР при прискорювальній напрузі 75 кВ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

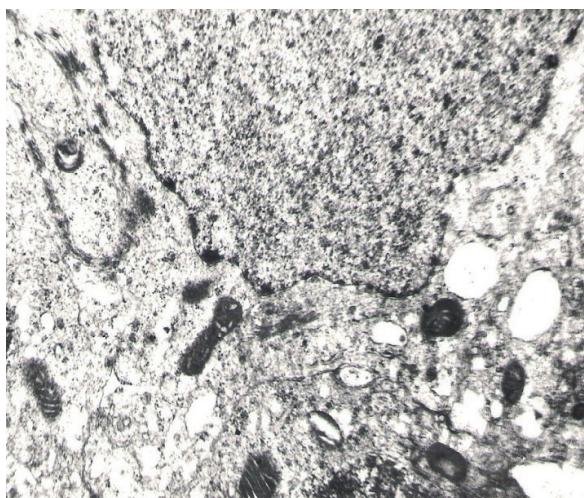
При дослідженні субмікроскопічної архітекtonіки контрольної групи тварин (1-ша

група) в препаратах спостерігалися клітини Сертолі й Лейдіга, а також сперматогонії і сперматоцити, що знаходилися на різних стадіях сперматогенезу. Ультраструктурна організація цих клітин відповідала сучасним уявленням [19]. Порушення внутрішньоклітинних мембранних структур були відсутні, що свідчило про адекватну гістологічну обробку матеріалу.

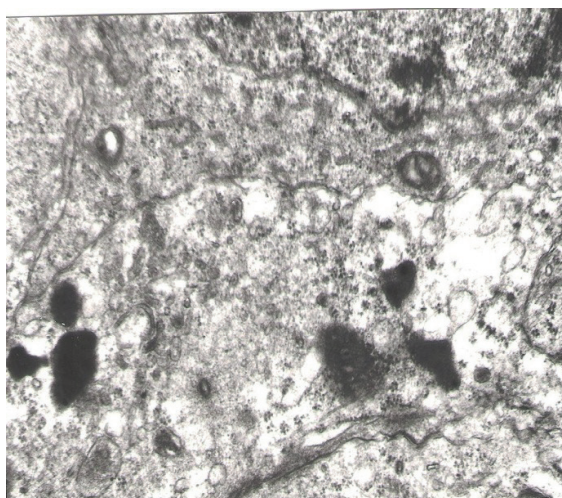
Електронно-мікроскопічне дослідження препаратів в групі щурів, яким вводили гідрохлорид серотоніну в дозі 5 мг/кг (2-га група), виявило описані раніше дистрофічні та деструктивні порушення субмікроскопічної організації органел клітин Сертолі та Лейдіга, а також сперматогенних клітин різної стадії диференціювання. Найбільш чутливими до негативного впливу гідрохлориду серотоніну були мітохондрії. Їх зовнішні мембрани набували розпушеного вигляду, найчастіше виявлявся вогнищевий лізис як зовнішніх мембран, так і крист, що свідчило про розвиток мітохондріальної дисфункції. Порушення біоенергетичного забезпечення синтетичних процесів структурно підтверджується редукцією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі, зменшенням кількості рибосом і полісом у цитоплазмі,

а також осередкової деструкцією мембран ендоплазматичного ретикулула. На розвиток катаболічних процесів вказує і поява в цитоплазмі клітин Сертолі та Лейдіга вторинних лізосом і включень ліпідів. Детальний опис субмікроскопічної організації цих клітин був описаний нами в раніше опублікованій праці [11].

Після введення біоглобін-У на тлі гідрохлориду серотоніну (3-тя група) було виявлено поліморфні зміни органел. Значна частина клітин Сертолі набувала типової будови з наявністю слабо виражених дистрофічних порушень. Ядра цих епітеліоцитів мали переважно деконденсований хроматин, гранули якого були дифузно розсіяні по каріоплазмі. Ядерна мембрана утворювала інвагінації різної глибини і не містила вогнищ лізису. У цитоплазмі розташовувалися численні мітохондрії, які мали електронно-щільний матрикс і досить велику кількість крист. Деякі мітохондрії приймали «гантелеподібну форму», що вказувало на активацію процесу ділення цих органел (рис. 1,а). Гладкий ендоплазматичний ретикулум був добре розвинений, його цистерни електроннопрозорі. Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був помірно гіпер-



а



б

Рис. 1. Ультраструктура підтримуючих епітеліоцитів сім'яників щурів, які отримували біоглобін-У на тлі гідрохлориду серотоніну: а – мітохондрії, що діляться, збільшення 31000; б - включення ліпідів у цитоплазмі, збільшення 36000

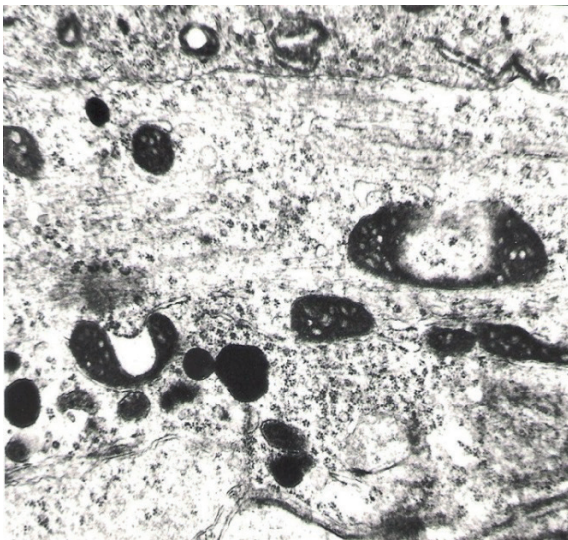
трофований. В зоні його локалізації виявлено включення ліпідів і фагоцитованого матеріалу. Цитоплазматична мембрана мала структуру, притаманну елементарній мембрані.

У препаратах зустрічалася невелика кількість підтримуючих епітеліоцитів, ультраструктура яких дистрофічна, а іноді і деструктивно порушена. Їх ядра містили переважно конденсований хроматин, брилки якого локалізувалися по периферії матриксу. Ядерна мембрана була сильно розпушена, а іноді вогнищево зруйнована. Агранулярний ендоплазматичний ретикулум був вакуолізованим, його мембрани розпушені. У цитоплазмі спостерігалася невелика кількість рибосом і полісом.

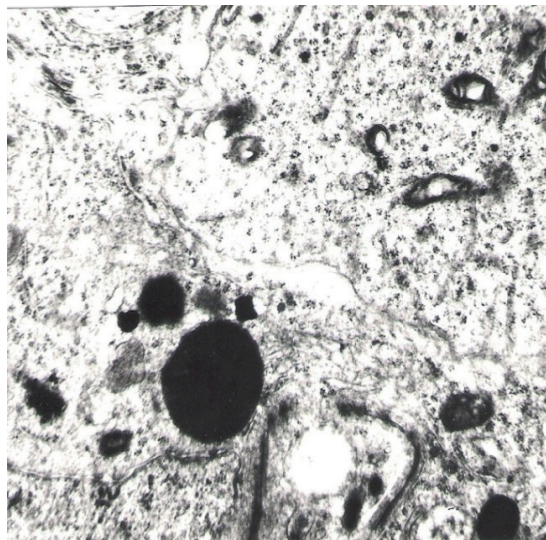
Мітохондрії розташовувалися в цитоплазмі у вигляді скупчень. Матрикс мітохондрій мав високу електронну щільність і гомогенну структуру. Кристи були сильно вкорочені. Спостерігалася осередкове розпушення і лізис зовнішніх мембран мітохондрій. У базальному відділі цитоплазми клітин Сертолі розташовувалися включення ліпідів. Цитоплазматична мембрана осміофільна і потовщена (див. рис. 1,б). Гладкий ендо-

плазматичний ретикулум представлений у вигляді дуже великих електронно-прозорих вакуолей. Найчастіше спостерігалася фрагментація його мембран. У цитоплазмі практично були відсутні рибосоми і полісоми. Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був редукованим, а його гладкі мембрани дезорганізованими. Гіалоплазма клітин Сертолі мала дуже низьку електронну щільність.

Ядра інтерстиціальних ендокриноцитів після введення біоглобіну-У на тлі гідрохлориду серотоніну містили хроматин як в конденсованій, так і в деконденсованій формах. Ядерна мембрана вогнищево розпушена, мала дрібні і глибокі інвагінації. Перинуклеарні простори дещо розширені. Вогнища деструкції ядерної мембрани практично були відсутні. Мітохондрії в клітинах Лейдіга надзвичайно відрізнялися за розмірами і формою, часто виявлялися на різних стадіях поділу. Матрикс мітохондрій мав високу електронну щільність і містив численні трубчасті кристи. Дуже рідко зустрічалися мітохондрії з вогнищами лізису зовнішньої мембрани (рис. 2,а). Плас-



а



б

Рис. 2. Ультраструктура інтерстиціальних ендокриноцитів сім'яників щурів, які отримували біоглобін-У на тлі гідрохлориду серотоніну: а - лізис зовнішніх мембран мітохондрій, збільшення 32000; б - включення ліпідів і секреторні гранули в цитоплазмі, збільшення 34000

тинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був гіпертрофованим, його гладкі мембрани паралельно орієнтовані і зібрані в стопки. Навколо них локалізувалися скупчення дрібних електронно-прозорих везикул. Цитоплазма містила численні рибосоми, зібрані в полісоми, а також включення ліпідів і секреторні гранули (див. рис. 2,б).

Таким чином, проведене дослідження ультраструктурної організації підтримуючих епітеліоцитів і інтерстиціальних ендокриноцитів сім'яників щурів після введення гідрохлориду серотоніну показало наявність дистрофічних і деструктивних порушень, оскільки у механізмі розвитку цієї патології провідну роль відіграє вазоконстрикторна дія гідрохлориду серотоніну, що викликає подальший розвиток порушення трофіки та виникнення патологічних змін у органі.

Найбільш чутливими до негативного впливу гідрохлориду серотоніну були мітохондрії. Їх зовнішні мембрани набували розпушеного вигляду, найчастіше виявлявся вогнищевий лізис як зовнішніх мембран, так і крист, що свідчило про розвиток мітохондріальної дисфункції. Порушення біоенергетичного забезпечення синтетичних процесів структурно підтверджується редукцією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі, зменшенням кількості рибосом і полісом у цитоплазмі, а також осередкової деструкцією мембран ендоплазматичного ретикулума. На розвиток катаболічних процесів вказує і поява в цитоплазмі клітин Сертолі і Лейдіга вторинних лізосом і включень ліпідів. Слід зазначити, що за глибиною і ступенем вираженості виявлені порушення органел лежать у межах фізіологічної компенсації і є зворотними після зняття негативного впливу гідрохлориду серотоніну.

Особливість застосування препаратів, які стимулюють метаболічні процеси, а саме біоглобін-У, полягає в тому, що вони активують різні захисні системи організму, головним чином ферментні, імунобіологічної

реактивності, нормалізацію гормональних функцій, тощо. Завдяки індукції, репресії, інгібіції, підвищенню енергетичного рівня різних ферментів впливають на метаболізм організму, чим і пояснюється широта діапазона їхньої дії. Також біоглобін-У виявляє аналгетичну та протизапальну дію. Після його введення на тлі гідрохлориду серотоніну прослідковується незначно виражена активність репаративних і синтетичних процесів у клітинах Сертолі. Зберігалися дистрофічно змінені мітохондрії, мембрани ендоплазматичного ретикулума мали вогнища лізису, а також залишався низьким вміст рибосом у цитоплазмі, що свідчить про наявність мітохондріальної дисфункції. Спостерігався помірно редукований пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі, поблизу якого іноді зустрічаються включення ліпідів, що вказує на досить високий рівень активності катаболічних процесів.

Отже, у групі експериментальних тварин, які отримували біоглобін-У, істотно зростає активність метаболічних процесів у клітинах Лейдіга, що структурно підтверджується збільшенням числа рибосом, гіпертрофією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі і збільшенням кількості секреторних гранул у цитоплазмі. Істотно зменшувалася кількість вогнищ деструкції мембран ендоплазматичного ретикулума і мембран як ядра, так і мітохондрій.

Таким чином, при введенні біоглобіну-У на тлі ураження яєчок гідрохлоридом серотоніну активність репаративних і синтетичних процесів у клітинах сім'яників зростає. Також зберігалася помірна мітохондріальна дисфункція, низький вміст рибосом у цитоплазмі і редукція пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі у щурів, які на тлі гідрохлориду серотоніну отримували препарат біоглобін-У у дозі 200 мкл/кг. Останній істотно активує метаболізм клітин Лейдіга, що структурно підтверджується збільшенням числа рибосом, секреторних

гранул, гіпертрофією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі. Введення біоглобіну-У значно знижує кількість вогнищ деструкції мембран ендоплазматичного ретикулума, ядра і мітохондрій в клітинах Сертолі та Лейдіга.

**Н. М. Бречка, В. П. Невзоров, В. А. Бондаренко,
Н. Г. Малова, Н. Ю. Селюкова**

**ИССЛЕДОВАНИЯ
СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЙ
АРХИТЕКТониКИ КЛЕТок СЕРТОЛИ
И ЛЕЙДИГА ПОСЛЕ ДЕСТРУКТИВНОГО
ВЛИЯНИЯ ГИДРОХЛОРИДА СЕРОТОНИНА
И ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ
МЕТАБОТРОПНЫМИ СРЕДСТВАМИ**

Представлены результаты исследования ультраструктурных изменений органелл клеток Сертоли и Лейди-га, подверженных воздействию гидрохлорида серотонина и введения биоглобина-У. Показано, что гидрохлорид серотонина вызывает на внутриклеточном уровне митохондриальную дисфункцию и активирует катаболические внутриклеточные процессы, а препарат биоглобин-У на его фоне повышает активность репаративных и синтетических реакций, снижает степень митохондриальной дисфункции и катаболических процессов, а также активирует метаболизм клеток Лейдига, и значительно снижает количество очагов деструкции мембран эндоплазматического ретикулума, мембран ядра и митохондрий.

Ключевые слова: ультраструктура клеток Сертоли и Лейдига; гидрохлорид серотонина; митохондриальная дисфункция; биоглобин-У.

**N. Brechka, V. Nevzorov, V. Bondarenko,
N. Malova, N. Selyukova**

**INVESTIGATIONS OF SUBMICROSCOPIC
ARCHITECTONICS SERTOLI AND LEYDIG
CELLS AFTER HYDROCHLORIDE
SEROTONIN DESTRUCTIVE IMPACT AND
THE POSSIBILITY OF CORRECTION BY
STIMULANTS OF METABOLIC PROCESSES**

The results of study of ultrastructural changes in the Sertoli cells and Leydig's cells organelles after destructive influence of the serotonin hydrochloride and under influence biogloblin-U have been presented. It was shown that serotonin hydrochloride causes mitochondrial dysfunction and activates intracellular catabolic processes on the intracellular level. Biogloblin-U increases the activity and reparative synthetic reactions, reduced the degree of mitochondrial dysfunction and

catabolic processes and activate the Leydig cell metabolism, and significantly reduces the number of foci destruction membranes of the endoplasmic reticulum, mitochondrial, and membranes of nucleus on the background of serotonin hydrochloride.

Key words: ultrastructure of Sertoli cells and Leydig cells; serotonin hydrochloride; mitochondrial dysfunction; biogloblin-U

*SI "V Danilevsky Institute of Endocrine Pathology
Problems of the NAMS of Ukraine", Kharkiv.*

REFERENCES

1. Bykov VL. Spermatogenesis males in the late twentieth century. Problems of reproduction. 2000; 1:6-13.
2. Gasparov A. Reproductive health. Infertility as a medical and social problem. Practical Guide. 2000; p.56.
3. Ter-Avanesov GV. Male fertility in the XXI century. Andrology and genital surgery. 2000, p.32.
4. Al-Rayess MM, Al-Rikabi AC. Morphologic patterns of male infertility in Saudi patients University Hospital experience. Saudi Med J. 2000 Jul;21(7):625-8.
5. Altay B. The effects of female age on the outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with azoospermia. Int Urol Nephrol. 2002;33(1):95-9.
6. Gogolevskiy PA. Using spermatids in IVF / ICSI. Problems of reproduction. 1998; 2:5-11.
7. Korjakin MV. Analysis of the causes of male infertility. Problems of reproduction. 2000; 5:48-53.
8. Loran OB, Segal A, Pushkar D. Assisted reproductive technology in urology. Urology. 2001; 4:39-42.
9. Pshenichnikova T. Infertility Married. Medical, 1991, p. 318.
10. Raitsina SS. Modern problems of spermatogenesis. Medicine, 1982, pp.73-107.
11. Brechka NM, Nevzorov VP, Bondarenko VA, Koreneva EM, Malova NG. Violation ultrastructure of Sertoli cells and Leydig cells under the influence of serotonin hydrochloride. Problems of endocrine pathology. 2012; 2:73-9.
12. Gorpichenko I, Gurzhenko AYU. Research Tribestan efficacy in the treatment of patients with erectile dysfunction. Men's Health. 2008; 8:89-94.
13. Rossikhin VV, Kozin YI. Opportunities biocorrection in urology and andrology. Scientific and practical significance in medicine bioglobina as bionormalizatorom: scientific-practical materials. conf. with int. participation. Kharkiv, 2001, p.5-8.
14. Rossikhin VV, Kozin YI. Bioglobina evaluation of patients with chronic pyelonephritis. Scientific and practical significance in medicine as bioglobina bionormalizatorom: scientific-practical materials. conf. with int. participation. Kharkiv, 2001, pp. 9-15.
15. Gavrilouk AM, Chopyak VV, Nakonechniy AI, Kurpish MA. Male factor in the pathogenesis of female infertility.

-
- Medical aspects of men's health. 2012; 3(1):42-8.
16. Kulikovskii VF, Oleinik NV, Osipov PG, Stepchenko OI. Phytotherapy patients with lower urinary tract syndrome. Modern high technologies. 2009; 6:41–2.
17. Butenko IG, Lar'yanovska YB. Correction drugs Yohimbe-genesis and Yohimbe-harmony disorders of spermatogenesis in rats caused by serotonin. Experimental and Clinical Medicine. – 2000; 3:18-21.
18. General ethical principles of animal experimentation. Endocrinology. 2003; 8(1):142-5.
19. Danilova L. Ultrastructural studies of spermatogenesis. Moscow: Nauka; 1978.
20. Dedov VI. Ultrastructure of Sertoli cells and Leydig cells in rats under normal conditions and under conditions of prolonged internal exposure. Cytology. 1980; 10(22):1153–7.

*Матеріал надійшов до
редакції 14.03.2014*