

Морфология sustentocytov (клеток Сертоли) при преждевременном старении, вызванном световым десинхронозом

Лариса Игоревна Кондакова ✉, Виктория Владимировна Багметова,
Михаил Васильевич Мальцев

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Влияние 30-суточной темновой депривации (свето-темновой цикл 24/0 ч, искусственное освещение 300 Лк) на морфофункциональное состояние семенников было изучено с помощью морфологического и морфометрического анализа гистологических препаратов белых беспородных самцов крыс 4-месячного возраста. Проведена оценка уровня фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Установлено, что 30-суточная темновая депривация повышает уровень фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови. Морфологические изменения семенников характеризовались уменьшением площади клеток Сертоли и их ядер, толщины сперматогенного эпителия. Гормональный фон и морфофункциональное состояние семенников были скорректированы введением экзогенного мелатонина в течение 14 суток.

Ключевые слова: семенники, sustentocyt (клетка Сертоли), преждевременное старение, темновая депривация, стресс, мелатонин, белок Клото

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-1-97-101>

Morphology of sustentocytes (Sertoli cells) with premature aging caused by light desynchronization

Larisa I. Kondakova ✉, Victoria V. Bagmetova, Mikhail V. Maltsev

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. The effect of 30-day dark deprivation (light-dark cycle 24/0 h, artificial illumination 300 Lux) on the morphofunctional state of the testes was studied using morphological and morphometric analysis of histological preparations of white mongrel male rats 4 months of age. The level of follicle-stimulating hormone in blood serum was assessed by enzyme immunoassay. It was found that 30-day dark deprivation increases the level of follicle-stimulating hormone in the blood serum. Morphological changes in the testes were characterized by a decrease in the area of Sertoli cells and their nuclei, the thickness of the spermatogenic epithelium. The hormonal background and morphofunctional state of the testes were corrected by the administration of exogenous melatonin for 14 days.

Keywords: testicles, interstitial endocrinocytes (Leydig cells), premature aging, dark deprivation, stress, melatonin, Klotho protein

Наступление информационной эры и повышение социально-экономического уровня привели к увеличению среднего возраста родителей при рождении первого ребенка. Это вызывает беспокойство, связанную с негативным влиянием возраста мужчин и женщин, на фертильность и возникновение репродуктивной дисфункции. С увеличением возраста родителей прогрессивно возрастает и роль экзогенных и эндогенных факторов, способствующих преждевременному старению, таких как стрессы, вредные привычки образа жизни, радиация, световой десинхроноз. Последний фактор приобретает все большее распространение на фоне растущей световой загрязненности городов, круглосуточной общедоступности информации, обращать к которой, ввиду высокой занятости работающего населения (большинство из которого относится к лицам фертильного

возраста), становится удобно в вечернее или, зачастую, в ночное время. Перечисленные негативные факторы могут спровоцировать нарушения мужской репродуктивной функции, вплоть до развития бесплодия [1, 2, 3]. Преждевременное старение мужских половых желез проявляется нарушением сперматогенных процессов, аномалиями и дисфункцией сперматозоидов, а также повреждением sustentocytov (клеток Сертоли) и интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига) и др. [4, 5]. Это обуславливает актуальность исследования преждевременного старения репродуктивной системы, вызванного темновой депривацией, как одной из причин валидных экспериментальных моделей преждевременного старения, которое может внести существенный вклад в разработку методов прогнозирования и/или снижения рисков нарушения фертильности [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить морфофункциональный статус sustentоцитов (клеток Сертоли) у крыс при преждевременном старении, вызванном темновой депривацией.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы 66 беспородных белых крыс самцов 4-месячного возраста (питомник филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область). Животные содержались в виварии при температуре 22–24 °С, относительной влажности воздуха 40–50 %. Для животных соблюдался стандартный пищевой рацион (полнорационный комбикорм, ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Ленинградская область, Россия) и свободный доступ к воде. Эксперименты проводили в соответствии с правилами лабораторной практики РФ (ГОСТ 33044-2014) и с соблюдением требований Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010. Эксперименты были одобрены локальным этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета (справка от 25.11.2022 № 2022/164).

Животные были разделены на три группы. Первая группа – контрольная ($n = 24$) включала животных, которые на протяжении всего времени исследования находились при 12-часовом искусственном свето-темновом режиме. Вторая группа животных ($n = 26$) и третья ($n = 16$) находились при 24-часовом искусственном освещении (300 Люкс) в течение 30 сут. Животные третьей группы после отмены 30-суточной темновой депривации получали внутрижелудочно через зонд 14-дневным лечебным курсом мелатонин (НАО «Северная звезда», Россия) в экспериментальной эффективной дозе 0,3 мг/кг [3] в 2%-й крахмальной слизи (в максимально допустимом объеме 0,2 мл/100 г) ежедневно, однократно в одно и то же время в интервале 18.00-19.30 по МСК. Животные первой и второй группы получали 2%-ю крахмальную слизь по аналогичной схеме в эквивалентном объеме.

По окончании введения мелатонина животным третьей группы и крахмальной слизи животным первой и второй групп через 20 ч после последнего введения животных наркотизировали путем однократного введения раствора хлоралгидрата (400 мг/кг) в воде очищенной (лаборатория токсикологии, НЦИЛС ВолгГМУ) внутривенно и забирали кровь из брюшной аорты крыс. Затем была проведена эвтаназия путем декапитации с помощью гильотины. Сыворотку крови центрифугировали (центрифуга название, серия, производитель) 20 мин при 3000 об./мин.

Концентрацию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) определяли в сыворотке крови с помощью

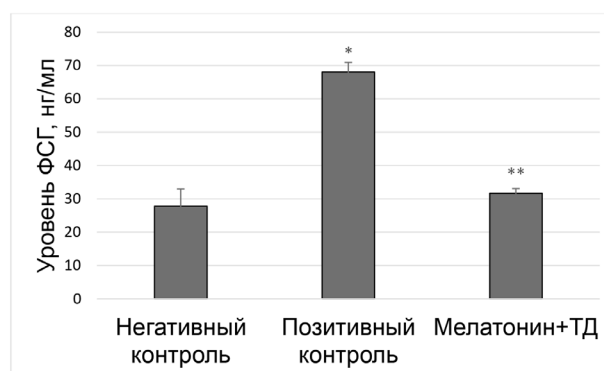
твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов ELISA Kit for Follicle Stimulating Hormone (FSH) производства CLOUD-CLONE CORP (США) на автоматическом микропланшетном фотометре Sunrise TS4TECAN (Tecan Austria GmbH, Австрия).

Гистологическое исследование семенников проводили по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микрофотографирование и морфометрический анализ семенников проводили на микроскопе Leica DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с использованием программного комплекса LAS v.4.7. Измеряли линейные показатели sustentоцитов и их ядер, оценивались морфологические особенности клеток Сертоли. В каждом поле зрения измерялась средняя площадь ядра, клетки и цитоплазмы.

Для статистической обработки полученных результатов применен ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна с использованием программы GraphPad Prism 8.0. Проверка распределения на нормальность проводилась с помощью критерия Шапиро – Уилка. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Содержание животных в условиях постоянного освещения в течение 30 сут. (вторая группа – позитивный контроль, животные которой подверглись темновой депривации) приводило к увеличению уровня ФСГ в сыворотке крови в 2,4 раза по сравнению с показателем животных из группы контроля (первая группа – негативный контроль, животные которой не подвергались темновой депривации), $p < 0,05$ (рис. 1).



* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ – по отношению к показателю группы животных негативного контроля (ранговый однофакторный анализ Краскела – Уоллиса, критерий Данна).

Рис. 1. Влияние 30-дневной темновой депривации на уровень фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови беспородных белых крыс самцов (свето-темновой цикл 24/0 ч, искусственное освещение 300 Люкс), $M \pm t$

Морфометрический анализ параметров клеток Сертоли яичка после моделирования преждевременного старения, вызванного 30-суточной темновой депривацией, показал статистически значимые изменения количества sustentocитов, параметров клетки и ядра по сравнению с показателями контрольных крыс самцов. Число sustentocитов уменьшилось на 5,4 %. Площадь sustentocитов у животных, подвергшихся темновой депривации, была меньше на 12,4 % по сравнению с показателем крыс из группы негативного контроля ($p < 0,05$), периметр клеток также был меньше – на 9 % ($p < 0,05$), площадь ядер клеток – на 17,4 % ($p < 0,05$). Ядра sustentocитов неправильной формы лежат ближе к просвету семенного канальца. Толщина сперматогенного эпителия уменьшилась за счет десквамации сперматоцитов I и II порядков.

После курсового перорального введения мелатонина у животных, подвергшихся темновой депривации (третья группа животных) число sustentocитов увеличилось на 3,4 %, площадь sustentocита и ядра была больше, чем у животных группы позитивного контроля на 3,4 и 7,9 % соответственно ($p < 0,05$).

Введение экзогенного мелатонина также способствовало увеличению периметра клетки по отношению к показателю животных из группы позитивного контроля на 5,7 %. При этом площадь клетки и ядра у животных, получавших после 30-суточной темновой депривации 14-дневным курсом мелатонин, была меньше показателя животных из группы негативного контроля на 9,4 и 10,9 % соответственно (рис. 2).

Клетки Сертоли с неправильной и нечеткой формой располагались на базальной мембране извитого семенного канальца, в их цитоплазме визуализировались светлые ядра, округло-овальной формы, смещенные к базальному полюсу, цитоплазма – эозинофильная. Просматривались все этапы сперматогенеза: сперматогонии – на базальной мембране на уровне ядер sustentocитов, сперматоциты первого порядка в мейозе I, сперматоциты второго порядка, сперматиды округлой формы и небольших размеров. В просвете семенных канальцев определялись сперматозоиды, обращенные головками в сторону апикального полюса sustentocитов. Наличие всех этапов сперматогенеза указывало на способность яичек вырабатывать сперматозоиды.

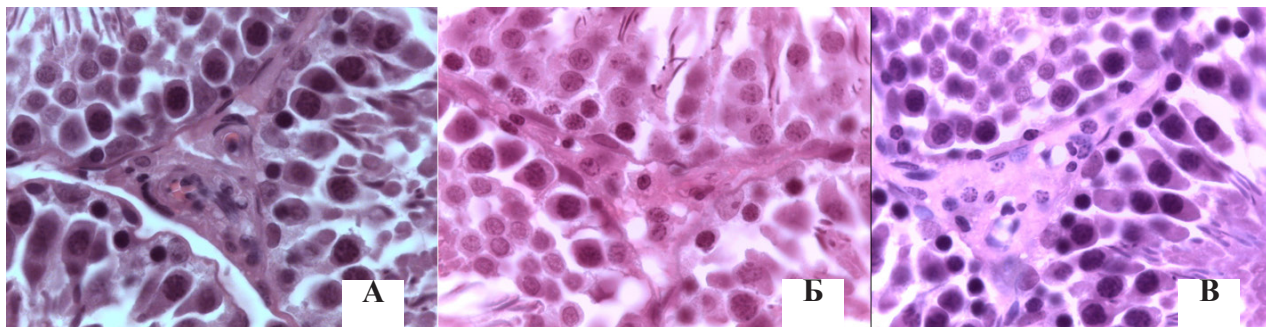


Рис. 2. Срез семенника крысы (окраска: гематоксилин и эозин, ув. $\times 100$):

А – негативный контроль, Б – позитивный контроль, В – опытная группа.

Процесс сперматогенеза регулируется гормонами гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Фолликулостимулирующий гормон гипофиза преимущественно воздействует через G-ассоциированные рецепторы на sustentocитах. Тестостерон, образующийся в клетках Лейдига, оказывает биологическое действие через андрогеновые рецепторы на клетках Сертоли. Под воздействием фолликулостимулирующего гормона и тестостерона в клетках Сертоли повышается активность ароматазы и секретируются андрогенсвязывающий белок, ингибин, активин, пептиды, электролиты и др. для обеспечения метаболических процессов и функционирования половых клеток. Клетки Сертоли поддерживают митоз и мейоз половых клеток, снабжают их питательными веществами и поддерживают межклеточные соединения: щелевые, десмосомные и адгезивные соединения с помощью сигнальных путей TGF- β / Smad, AMPK и MAPK.

Оптимальное количество клеток Сертоли и их функционирование на протяжении всей жизни является ключом к здоровой функции яичка, включая образование сперматозоидов и выработку андрогенов.

Выявленное у самцов крыс, подвергшихся 30-суточной темновой депривации, уменьшение числа sustentocитов, периметра и площади клеток, а также площади ядра по сравнению со значениями показателей крыс, находившихся на протяжении всего исследования в условиях 12-часового свето-темного цикла, указывает на развитие их функциональной недостаточности и дистрофических изменений, которые не компенсируются повышенной выработкой ФСГ, действие которого направлено на стимуляцию метаболической активности данных клеток. Повышение уровня ФСГ в условиях дефицита мелатонина, вызванного темновой депривацией, может быть следствием недостаточного его тормозящего влияния на выработку гонадотропинов.

Мелатонин, являясь антиоксидантом, воздействует как непосредственно на свободные радикалы и через рецепторы, так и опосредованно через стимуляцию эндогенных антиоксидантных ферментов. Вероятно, окислительный стресс, возникающий вследствие дефицита мелатонина, является одним из ведущих факторов в развитии морфофункциональных нарушений клеток Сертоли у крыс самцов, подвергшихся 30-дневной темновой депривации. Частичная компенсация выявленных морфофункциональных нарушений клеток Сертоли у самцов крыс, подвергшихся темной депривации и получавших затем экзогенный мелатонин свидетельствует о том, что дефицит мелатонина способствует развитию выявленных нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преждевременное старение является основным фактором риска развития различных заболеваний, в том числе репродуктивной системы. Темновая депривация в течение 30 суток через центральные механизмы приводит к нарушению регуляции репродуктивных процессов через снижение синтеза мелатонина, обладающего антигонадотропными свойствами, повышению выработки фолликулостимулирующего гормона и уменьшению линейных параметров сустентоцитов. Значительное снижение объема сустентоцитов и их гибель может привести к гибели половых клеток и бесплодию. Однако регуляция мужской фертильности является сложным механизмом. Изучение изменений, связанных со старением в органах мужской репродуктивной системы, позволит выявить и охарактеризовать корреляционные связи между биомаркерами и разработать математическую модель преждевременного старения репродуктивной системы, а также разработать методические подходы к доклиническим исследованиям геропротективных средств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гостюхина А.А., Замощина Т.А., Зайцев К.В. и др. Адаптивные реакции крыс после световых десинхронозов и физического переутомления. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018;17(3):22–34.
2. Злобина О.В., Москвина А.О., Иванов А.Н., Бугаева И.О. Функциональная активность звеньев стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем в услови-

ях светового десинхроноза. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2021;107(3):31–320.

3. Кондакова Л.И., Багметова В.В., Сиротенко В.С., Доница А.Д. Влияние мелатонина на динамику массы тела и уровень белка Клото в крови у животных с преждевременным старением, вызванным темновой депривацией. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2022;19(4):110–117.
4. Iliadou P.K., Tsametsis C., Kaprara A., Papadimas I., Goulis, D. G. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones (Athens, Greece)*. 2015;14(4):504–514.
5. Ruthig V.A., Lamb D.J. Updates in Sertoli Cell-Mediated Signaling During Spermatogenesis and Advances in Restoring Sertoli Cell Function. *Frontiers in endocrinology*. 2022;13:897196.
6. Dong S., Chen C., Zhang J. et al. Testicular aging, male fertility and beyond. *Frontiers in endocrinology*. 2022;13:1012119.

REFERENCES

1. Gostyuxina A.A., Zamoshhina T.A., Zajcev K.V. et al. Anavar reactions of rats after light desynchronization and physical overwork. *Byulleten' sibirskoj mediciny = Siberian Medicine Bulletin*. 2018;17(3):22–34. (In Russ.)
2. Zlobina O.V., Moskvina A.O., Ivanov A.N., Bugaeva I.O. Functional activity of links of stress-implementing and stress-limiting systems under conditions of light desynchronization. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Physiological Journal named after I.M. Sechenov*. 2022;19(4):110–117. (In Russ.)
3. Kondakova L.I., Bagmetova V.V., Sirotenko V.S., Donica A.D. The effect of melatonin on body weight dynamics and blood levels of Klotto protein in animals with premature aging caused by dark deprivation. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*. 2022;19(4):110–117. (In Russ.)
4. Iliadou P.K., Tsametsis C., Kaprara A., Papadimas I., Goulis, D. G. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones (Athens, Greece)*. 2015;14(4):504–514.
5. Ruthig V.A., Lamb D.J. Updates in Sertoli Cell-Mediated Signaling During Spermatogenesis and Advances in Restoring Sertoli Cell Function. *Frontiers in endocrinology*. 2022;13:897196.
6. Dong S., Chen C., Zhang J. et al. Testicular aging, male fertility and beyond. *Frontiers in endocrinology*. 2022;13:1012119.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Л.И. 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

В.В. Багметова – доктор медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории синтеза инновационных лекарственных средств отдела синтеза и фармтехнологий Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-

промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4861-0217>, vvbagmetova@gmail.com

М.В. Мальцев – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории токсикологии отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-3205-6493>, m_maltsev_biolog@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 22.12.2022; одобрена после рецензирования 11.01.2023; принята к публикации 16.03.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the author

L.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

V.V. Bagmetova – Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Senior Researcher of the Laboratory for the Synthesis of Innovative Medicines of the Department of Synthesis and Pharmaceutical Technologies of the Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4861-0217>; vvbagmetova@gmail.com

M.V. Maltsev – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Laboratory of Toxicology of the Department of Experimental Pharmacology and Toxicology of the Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; <http://orcid.org/0000-0002-3205-6493>; m_maltsev_biolog@rambler.ru

The article was submitted 22.12.2022; approved after reviewing 11.01.2023; accepted for publication 16.03.2023.