

DOI 10.31718/2077-1096.20.3.205

УДК 616.67:577.175.6:599.323.4

Стецук Е.В., Акимов О.Е., Мищенко А.В.

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА В СЕМЕННИКАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ДЕПРИВАЦИИ СИНТЕЗА ТЕСТОСТЕРОНА

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава.

*Мужские половые гормоны в общем и тестостерон в частности играют важную роль не только на этапе полового созревания молодых мужчин, но и необходимы для поддержания межклеточного взаимодействия в семенниках. Открытым остаётся вопрос касательно влияния центральной регуляции синтеза тестостерона на изменения в семенниках при длительной депривации стимула к продукции тестостерона. Целью данного исследования было изучение изменений в продукции оксида азота и супероксидного анион-радикала, морфологических изменений в семенниках крыс в условиях длительной (270 и 365 дневной) центральной депривации синтеза тестостерона. Опыты проведены на 15 половозрелых белых крысах - самцах линии «Вистар». Животные были разделены на 3 группы по 5 животных. Первая группа (контрольная) получала подкожно инъекцию хлорида натрия 0,9% на протяжении 365 дней. Во второй и третьей группе проводили центральную депривацию синтеза тестостерона на протяжении 270 и 365 дней соответственно. Центральную депривацию синтеза тестостерона моделировали путём введения дифферелина (трипторелина) в дозе 0,3 мг/кг подкожно. На 270-е сутки эксперимента отмечались изменения в интерстициальной ткани, с проявлениями фиброза. Нарушения в микрососудистой русле проявлялись дисфункцией эндотелия и увеличением плотности сосудистой стенки, связанное как с качественным, так и с количественным составом изменённых интерстициальных клеток и микрососудов. 365-е сутки эксперимента, как и предыдущий срок эксперимента, характеризовались изменениями как в паренхиматозных, так и в интерстициальных компонентах семенников. В интерстициальной ткани можно отметить фиброз со уменьшением количественного состава интерстициальных эндокриноцитов. Интерстициальные пространства между извитыми канальцами увеличены в сравнении с предыдущим сроком эксперимента. Продукция оксида азота была снижена на 270 и 365 сутки эксперимента на 68,5% и 42,6% соответственно, а продукция супероксидного анион-радикала была повышена в 5 и 5,5 раз соответственно. Центральная депривация синтеза тестостерона на 270 и 365 суток приводит к фиброзу и системному стазу интерстиции с последующим нарушением структурной организации извитых семенных канальцев, нарушению гемодинамики, эндотелиальной дисфункции, увеличению плотности сосудистой стенки кровеносных сосудов. Снижение продукции оксида азота конститутивными изоформами NO-синтазы при центральной депривации синтеза тестостерона на 270 и 365 суток приводит к увеличению продукции активных форм кислорода в семенниках крыс.*

Ключевые слова: оксид азота, супероксидный радикал, семенники, крысы, дифферелин, тестостерон

*Работа является частью инициативной научно-исследовательской работы: «Экспериментально-морфологическое изучение действия криоконсервированных препаратов кордовой крови и эмбриофетоплацентарного комплекса, дифферелина, этанола и 1% эфира метакриловой кислоты на морфофункциональное состояние ряда внутренних органов» (№ госрегистрации 0119U102925)*

### Вступление

Мужские половые гормоны в общем и тестостерон в частности играют важную роль не только на этапе полового созревания молодых мужчин, но и необходимы для поддержания межклеточного взаимодействия в семенниках. Так тестостерон способствует изменению поляризации макрофагов в сторону преобладания M2-фенотипа (противовоспалительный фенотип), что способствует увеличению экспрессии генов аргиназы, которая приводит к увеличению концентрации полиаминов в тканях семенников (путресцин, спермидин, спермин) [1].

Интерстициальных макрофагов семенников следует рассматривать как своеобразных «хранителей плодородия», благодаря их иммуносупрессивным функциям, защищающим сперматогенез от аутоиммунной атаки [2]. Защитная функция интерстициальных макрофагов семенников обусловлена тестостероновой модуляци-

ей их фенотипа. В эксперименте было показано, что локальное повреждение интерстициальных эндокриноцитов дезоксиниваленолом приводит к дефициту тестостерона и сопровождается воспалением в семенниках, которое ассоциировано со сменой поляризации макрофагов в сторону преобладания M1-фенотипа (провоспалительного) [3].

Таким образом, местное повреждающее влияние на тестостерон-продуцирующие клетки приводит к активации резидентных макрофагов и повреждению гемато-тестикулярного барьера с последующей демаскировкой антигенов и вовлечением в процесс аутоагрессии специфического иммунного ответа. Восстановление популяции интерстициальных эндокриноцитов с помощью стволовых клеток приводит к нормализации межклеточных взаимодействий [4].

Открытым остаётся вопрос касательно влияния центральной регуляции синтеза тестостеро-

на на изменения в семенниках при длительной депривации стимула к продукции тестостерона. В своей предыдущей работе нами было показано, что 180 дневная центральная депривация синтеза тестостерона сопровождается динамическим увеличением продукции оксида азота и продукции супероксидного анион-радикала, что приводит к появлению фиброзных изменений в семенниках на последнем сроке исследования [5]. Сохраняется ли схожая динамика изменений в семенниках на более длительном сроке центральной депривации синтеза тестостерона, в научной литературе не описано.

Целью данного исследования было изучение изменений в продукции оксида азота и супероксидного анион-радикала, морфологических изменений в семенниках крыс в условиях длительной (270 и 365 дневной) центральной депривации синтеза тестостерона.

### **Материалы и методы**

Опыты были проведены на 15 половозрелых белых крысах - самцах линии «Вистар». Животные были разделены на 3 группы по 5 животных. Первая группа (контрольная) получала подкожно инъекцию хлорида натрия 0,9% на протяжении 365 дней. Вторая группа (экспериментальная), в которой моделировалась центральная депривация синтеза тестостерона, получала подкожно инъекцию дифферелина (трипторелина) в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 270 дней [6]. Третья группа (экспериментальная) получала подкожно инъекцию дифферелина в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 365 дней [6].

Все манипуляции с лабораторными животными проводились в строгом соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986).

Животных выводили из эксперимента под кетамининовым наркозом. Отпрепарированные маленькие кусочки семенников фиксировали и заключали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистологические препараты изучали с помощью светового микроскопа с цифровой микрофотонасадкой фирмы Olympus C 3040-ADU с адаптированными для данных исследований программами (Olympus DP - Soft, лицензия № VJ285302, VT310403, 1AV4U13B26802) и Biorex 3 (серийный номер 5604). Все биохимические исследования проводились в 10% гомогенате тканей семенников с использованием спектро-

фотометра Ulab 101.

Общую продукцию оксида азота оценивали по общей активности NO-синтаз (gNOS). Об активности gNOS судили по приросту нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ) после инкубации в трис-буферном растворе (pH=7,4) содержащем субстрат реакции и донор электронов (НАДФН-восстановленный). Концентрацию нитритов определяли с помощью реактива Грисса-Илосвая на длине волны 540 нм [7]. Также определяли активность индуцибельной (iNOS) и конститутивных (cNOS) изоформ с использованием селективного ингибитора iNOS – амминогуанидина гидрохлорида (Sigma, чда), как описано в работе Yelins'ka A.M. [7].

Базовую продукцию супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) определяли по приросту диформазана, образованного в реакции  $\text{O}_2^{\cdot-}$  с нитросиним тетразолием после инкубации в буферном растворе (pH=7,4) содержащим гидроксид натрия. Концентрацию диформазана определяли спектрофотометрически на длине волны 540 нм [7].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Excel пакета Microsoft Office и расширения к ней Real Statistics 2019. Для определения статистической значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Разницу считали статистически значимой при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

На 270-е сутки эксперимента отмечались изменения в интерстициальной ткани, с проявлениями фиброза. Нарушения в микрососудистой русле проявлялось дисфункцией эндотелия и увеличением плотности сосудистой стенки, связанным как с качественным, так и с количественным составом измененных интерстициальных клеток и микрососудов (Рис.1).

Изменения интерстициальной ткани проявлялись в количественном увеличении артериол, венул и капилляров в поле зрения. Определялась вазодилатация артериол и венул, извилистость прекапилляров. Капилляры увеличены на фоне общего застоя. Со стороны интерстициальных эндокриноцитов наблюдается тенденция к количественному уменьшению по сравнению с контрольной группой. Кроме того, между извилинами канальцами выявлялись интерстициальные пространства с полным отсутствием интерстициальных эндокриноцитов. Интерстициальные эндокриноциты были уменьшены в размерах, их ядра гетерохромные, в цитоплазме было небольшое количество липидных гранул.

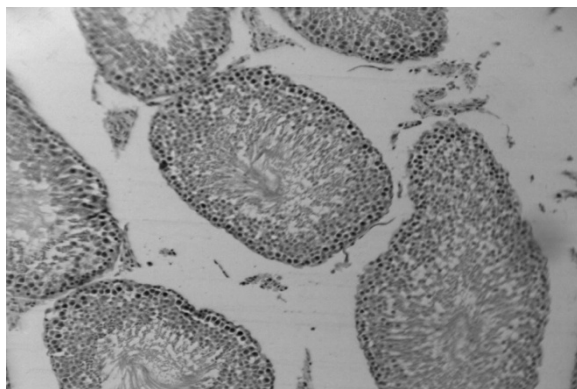


Рис. 1. Извитые семенные каналцы на 270-й день эксперимента. Полутонкий срез. Окр. Гематоксилин – еозин. Увеличение 400.

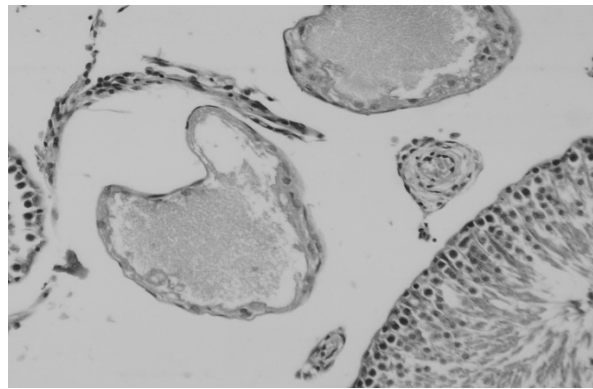


Рис. 2. Извитые семенные каналцы на 365-й день эксперимента. Полутонкий срез. Окр. Гематоксилин – еозин. Увеличение – 600.

Кроме интерстициальных эндокриноцитов, в соединительной ткани были обнаружены макрофаги, которые имели две популяции клеток. Первой популяцией клеток были париетальные макрофаги, они были сплющены и прилегали к стенке каналцев. Клетками второго типа были интерстициальные макрофаги, расположенные вблизи кровеносных сосудов. Количество пристеночных преобладало в несколько раз над интерстициальными.

Также мы наблюдали нарушения структурной организации извитых семенных каналцев. В извитых семенных каналцах сначала происходила дисконфлексация и дезориентация клеток сперматогенного ряда. Выявлялась десквамация сперматид, в ядрах которых определялась гипохромия и пикноз. Происходила также дезориентация, дисконфлексация вторичных сперматоцитов, потом и первичных, а иногда и их десквамация. За счет полного или частичного отслоения клеток сперматогенного эпителия от базальной мембраны в просвете каналцев образовывались «семенные шары». Уменьшилось количество сперматогоний типа А и В. Кое-где оказывались извитые семенные каналцы с полным отсутствием клеточных элементов.

365-е сутки эксперимента, как и предыдущий срок эксперимента, характеризовались изменениями как в паренхиматозных, так и в интерстициальных компонентах семенников. В интерстициальной ткани можно отметить фиброз со уменьшением количественного состава интерстициальных эндокриноцитов. Интерстициальные пространства между извитыми каналцами увеличены в сравнении с предыдущим сроком эксперимента (Рис.2.). Наблюдались морфологические признаки дисфункции эндотелия сосудов, нарушения гемодинамики, периваскулярный фиброз с уменьшением объема микрососудов с последующим фиброзом интерстиции в целом.

Со стороны извитых семенных каналцев определяется нарушение всех этапов сперматогенеза. Клетки набухшие, дезориентированы в пространстве каналцев. Выявляется увеличенное количество семенных каналцев с полным отсутствием клеток сперматогенного ряда и поддерживающих клеток.

Центральная депривация синтеза тестостерона в течении 270 дней приводит к снижению продукции оксида азота на 68,5% при сравнении с контрольной группой (Рис. 3).

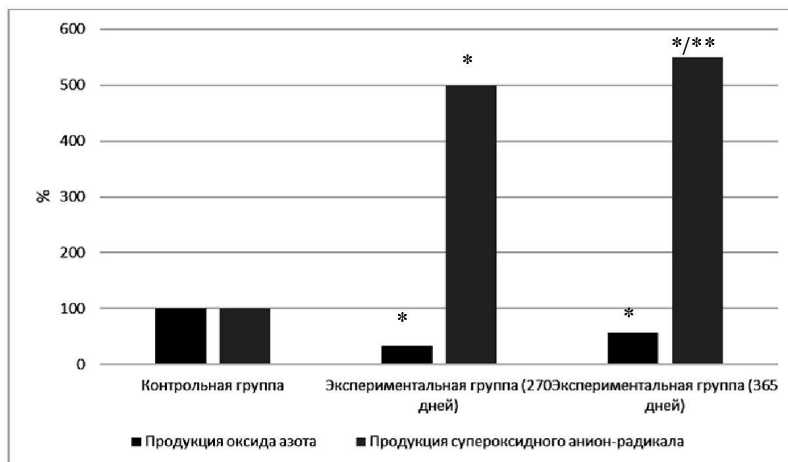


Рис.3. Изменения продукции оксида азота и супероксидного анион-радикала в семенниках крыс при длительной центральной депривации синтеза тестостерона. Примечание: \* - различия статистически значимы при сравнении с контрольной группой; \*\* - различия статистически значимы при сравнении с 270 днём эксперимента.

В этих условиях продукция супероксидного анион-радикала увеличивается в 5 раз при сравнении с контрольной группой. Центральная депривация синтеза тестостерона в течении 365 дней приводит к снижению продукции оксида азота на 42,6% при сравнении с контрольной группой. Продукция супероксидного анион-радикала увеличивается в 5,5 раз при сравнении с контрольной группой. Статистически значимая разница между продукцией оксида азота на 270 и 365 дни эксперимента отсутствует. Од-

нако продукция супероксидного анион-радикала на 365 день увеличивается на 10% при сравнении с 270 днём эксперимента.

Анализируя активности изоформ NOS, следует отметить тенденцию к снижению активностей конститутивных изоформ (Рис. 4). Так, на 270-й день центральной депривации синтеза тестостерона активность iNOS статистически значимо не изменяется, а активность cNOS снижается в 8,2 раза.

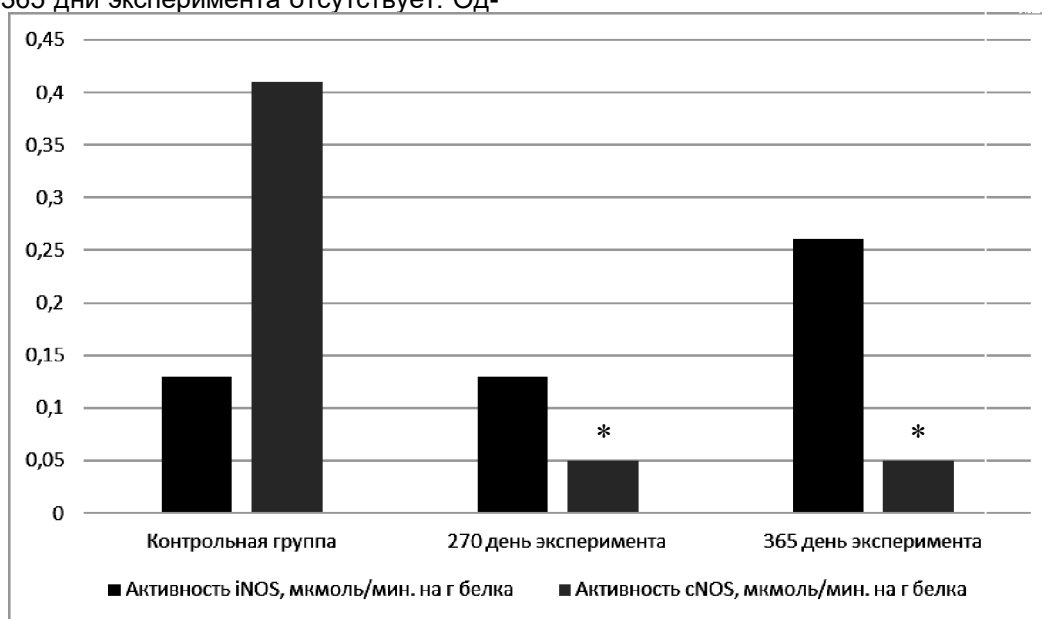


Рис. 4. Изменения активности iNOS и cNOS в семенниках крыс при длительной центральной депривации синтеза тестостерона. Примечание: \* - различия статистически значимы при сравнении с контрольной группой.

Статистически значимых изменений в активности iNOS при сравнении с контрольной группой и 270-м днём эксперимента не обнаружено. Активность cNOS остаётся сниженной в 8,2 раза при сравнении с контрольной группой. Активность cNOS на 365 день статистически значимо не изменяется при сравнении с 270-м днём эксперимента.

В наших предыдущих исследованиях мы установили, что повышенная продукция оксида азота приводит к оксидативному повреждению ткани семенников с последующим развитием фиброза на 180-й день эксперимента [5]. Главным звеном патогенеза в этот период эксперимента можно считать повышенную продукцию оксида азота от iNOS [8, 9]. Начиная с 270 дня центральной депривации синтеза тестостерона эта тенденция претерпевает изменения, поскольку активность iNOS в этот период не превышает таковую у контрольной группы животных. Тенденция к снижению активности cNOS отмечается с первых сроков эксперимента и продолжается вплоть до 365 дня эксперимента [5, 8, 9].

Таким образом, происходит своеобразное

«изменение роли» оксида азота в патогенезе повреждения семенников при центральной депривации синтеза тестостерона диферелином. В первом периоде эксперимента (с 1 по 180 день) избыточная продукция оксида азота приводит к повреждению семенников, а во втором периоде (с 270 по 365 день) недостаточная продукция оксида азота приводит к повреждению тканей семенников.

Оксид азота, который продуцируется митохондриальной NO-синтазой, способен регулировать продукцию активных форм кислорода в митохондриях [10]. Ингибция эндотелиальной NO-синтазы может привести к разобщению данного фермента со своим субстратом, что приводит к продукции супероксидного анион-радикала этим ферментом вместо оксида азота [10]. Следовательно, снижение активности конститутивных изоформ NO-синтазы в семенниках крыс при длительной центральной депривации синтеза тестостерона может быть причиной излишней продукции супероксидного анион-радикала от митохондриальной и микросомальной электронно-транспортных цепей.

### Выводи

1. Центральна депривація синтезу тестостерона на 270 і 365 суток приводить до фіброзу і системному стазу інтерстиції з наступним порушенням структурної організації звиваних сім'яних каналців, порушенню гемодинаміки, ендотеліальної дисфункції, збільшенню щільності судинної стінки кровеносних судин.

2. Зниження продукції оксиду азоту конститутивними ізоформами NO-синтази при центральній депривації синтезу тестостерона на 270 і 365 суток приводить до збільшення продукції активних форм кисню в сім'яниках криси.

### Література

1. Ren X, Fu X, Zhang X, Chen S, Huang S, Yao L et al. Testosterone regulates 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and epididymal fat accumulation in mice through modulating macrophage polarization. *Biochem Pharmacol.* 2017; 140: 73-88. doi: 10.1016/j.bcp.2017.05.022.
2. Mossadegh-Keller N, Sieweke MH. Testicular macrophages: Guardians of fertility. *Cell Immunol.* 2018; 330: 120-125. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.03.009.
3. Cao Z, Huang W, Sun Y, Li Y. Deoxyvalenol induced spermatogenesis disorder by blood-testis barrier disruption associated with testosterone deficiency and inflammation in mice. *Environ Pollut.* 2020; 264: 114748. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114748.
4. Xia K, Chen H, Wang J, Feng X, Gao Y, Wang Y et al. Restorative functions of Autologous Stem Leydig Cell transplantation in a Testosterone-deficient non-human primate model. *Theranostics.* 2020; 10(19): 8705-8720. doi: 10.7150/thno.46854.
5. Stetsuk EV, Akymov OE, Myshchenko AV. Rol' aktyvnykh form kysloroda y azota v razvytyy fybroza v semennykh krysh pry dlytel'noy tsentral'noy depriyatsyy synteza testosterone [The role of reactive oxygen species and nitrogen in the development of fibrosis in the testes of rats during prolonged central deprivation of testosterone synthesis]. *Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visnyk Ukrayins'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi.* 2020; 20(2): 175-181. doi: 10.31718/2077-1096.20.2.175
6. Botté MC, Lerrant Y, Lozach A, Bérault A, Counis R, Kottler ML. LH down-regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor, but not GnRH, mRNA levels in the rat testis. *J Endocrinol.* 1999; 162(3): 409-15.
7. Yelins'ka AM, Akimov OYe, Kostenko VO. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91(1): 80-85. doi: 10.15407/ubj91.01.080.
8. Stetsuk YeV, Kostenko VO, Shepitko VI, Goltsev AN. Influence of the 30-days central deprivation of testosterone synthesis on the morphological and functional features of rat testicular interstitial endocrinocytes and sustentocytes. *World of Medicine and Biology.* 2019; 4(70): 228-233. doi: 10.26724/2079-8334-2019-4-70-228-233.
9. Stetsuk YeV., Akimov OYe., Shepitko KV., Goltsev AN. Morphofunctional features of rat testes interstitial endocrinocytes and sustentocytes after 90 days of central testosterone synthesis deprivation. *World of Medicine and Biology.* 2020; 1(71): 226-231. doi: 10.26724/2079-8334-2020-1-71-226-231.
10. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev.* 2019; 99(1): 311-379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.

### Реферат

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТА ПРОДУКЦІЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА АЗОТУ В СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ СИНТЕЗУ ТЕСТОСТЕРОНУ

Стецук Є.В., Акімов О.Є., Міщенко А.В.

Ключові слова: оксид азоту, супероксидний радикал, сім'яники, щури, диферелін, тестостерон

Чоловічі статеві гормони взагалі та зокрема тестостерон грають важливу роль не тільки на етапі статевого дозрівання молодих чоловіків, а й необхідні для підтримки міжклітинної взаємодії в сім'яниках. Відкритим залишається питання щодо впливу центральної регуляції синтезу тестостерону на зміни в сім'яниках при тривалій депривації стимулу до продукції тестостерону. Метою даного дослідження було вивчення змін в продукції оксиду азоту і супероксидного аніон-радикала, морфологічних змін в сім'яниках щурів в умовах тривалої (270 і 365 денний) центральної депривації синтезу тестостерону. Досліди були проведені на 15 статевозрілих білих щурах - самцях лінії «Вістар». Тварини були розділені на 3 групи по 5 тварин. Перша група (контрольна) отримувала підшкірно ін'єкцію хлориду натрію 0,9% протягом 365 днів. У другій і третій групі проводили центральну депривацію синтезу тестостерону протягом 270 і 365 днів відповідно. Центральну депривацію синтезу тестостерону моделювали шляхом введення дифереліну (триптореліну) в дозі 0,3 мг / кг підшкірно. На 270-ту добу експерименту відзначалися зміни в інтерстиціальній тканині, з проявами фіброзу. Порушення в мікросудинному руслі виявлялося дисфункцією ендотелію і збільшенням щільності судинної стінки, пов'язане як з якісним, так і з кількісним складом змінених інтерстиціальних клітин і мікросудин. 365-та доба експерименту, як і попередній термін експерименту, характеризувалась змінами як в паренхіматозних, так і в інтерстиціальних компонентах сім'яників. В інтерстиціальній тканині можна відзначити фіброз із зменшенням кількісного складу інтерстиціальних ендокриноцитів. Інтерстиціальні простори між звитими каналцями збільшені в порівнянні з попереднім терміном експерименту. Продукція оксиду азоту була знижена на 270 і 365 добу експерименту на 68,5% і 42,6% відповідно, а продукція супероксидного аніон-радикала була підвищена в 5 і 5,5 разів відповідно. Центральна депривація синтезу тестостерону на 270 і 365 добу призводить до фіброзу і системного стазу інтерстиції з подальшим порушенням структурної організації звиваних сім'яних каналців, порушенням гемодинаміки, ендотеліальної дисфункції та збільшення щільності судинної стінки кровеносних судин. Зниження продукції оксиду азоту конститутивними ізоформами NO-синтази при центральній депривації синтезу тестостерону на 270 і 365 днів призводить до збільшення продукції активних форм кисню в сім'яниках щурів.

### **Summary**

MORPHOLOGICAL CHANGES AND PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES IN RAT TESTES UNDER CONDITIONS OF PROLONGED CENTRAL DEPRIVATION OF TESTOSTERONE SYNTHESIS

Stetsuk Ye.V., Akimov O.Ye., Mishchenko A.V.

Key words: nitric oxide, superoxide radical, testes, rats, dipherelin, testosterone

Male sex hormones in general, and testosterone in particular, play an important role not only during puberty in young men; they are also needed to maintain intercellular interaction in the testes. The question regarding the influence of the central regulation of testosterone synthesis on changes in the testes during prolonged deprivation of the stimulus to testosterone production is still open. The aim of this research was to study changes in the production of nitric oxide and superoxide anion radical, morphological changes in the testes of rats under conditions of prolonged (270 and 365 days) central deprivation of testosterone synthesis. The experiments were carried out on 15 sexually mature white male rats of the Wistar line. The animals were divided into 3 groups of 5 animals in each. The first group (control) received subcutaneous injection of sodium chloride 0.9% for 365 days. In the second and third groups, central deprivation of testosterone synthesis was performed for 270 and 365 days, respectively. Central deprivation of testosterone synthesis was modelled by the administration of dipherelin (triptorelin) in a dose of 0.3 mg / kg subcutaneously. On the 270th day of the experiment, changes were noted in the interstitial tissue, with manifestations of fibrosis. Disturbances in the microvascular bed were manifested by endothelial dysfunction and an increase in the density of the vascular wall, associated with both the qualitative and quantitative composition of altered interstitial cells and microvessels. The 365th day of the experiment, like the previous period of the experiment, was characterized by changes in both parenchymal and interstitial components of the testes. In the interstitial tissue, fibrosis can be noted with a decrease in the quantitative composition of interstitial endocrinocytes. The interstitial spaces between the convoluted tubules are enlarged in comparison with the previous period of the experiment. The production of nitric oxide reduced on 270th and 365th days of the experiment by 68.5% and 42.6%, respectively, and the production of superoxide radical anion was increased in 5 and 5.5 times, respectively. Central deprivation of testosterone synthesis on 270th and 365th days leads to fibrosis and systemic stasis of the interstitial tissue with subsequent disruption of the structural organization of the convoluted seminiferous tubules, violation of hemodynamics, endothelial dysfunction, and an increase in the density of the vascular wall of blood vessels. A decrease in the production of nitric oxide by constitutive isoforms of NO-synthase with central deprivation of testosterone synthesis by 270 and 365 days results in an increase in the production of reactive oxygen species in the testes of rats.