

DOI 10.31718/2077–1096.23.2.2.52

УДК 616.682:599.323.452+615.357:563.132

Стецюк Є.В., Шепитько В.І., Борута Н.В., Пелипенко Л.Б., Волошина О.В.

ЕЛЕКТРОНОМІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ ПЕРИТУБУЛЯРНИХ МАКРОФАГІВ СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО БЛОКУВАННЯ СИНТЕЗУ ЛЮТЕЇНІЗУЮЧОГО ГОРМОНУ ТРИПТОРЕЛІНОМ ЗА 90 ДІБ СПОСТЕРЕЖЕННЯ.

Полтавський державний медичний університет

Вступ. Макрофаги — це клітини вродженої імунної системи, які відіграють безліч ролей в організмі. Відомо, що макрофаги знаходяться в ендокринних залозах, і тепер є багато доказів того, що ці клітини тісно взаємодіють з ендокринними клітинами. Імуно-ендокринні взаємодії важливі для розвитку ендокринних залоз та їх функціонування під час фізіологічних станів, а також стають ключовими гравцями в патофізіологічних станах. Завдяки профілюванню експресії генів різноманітні субпопуляції тканинних макрофагів були виявлені в ендокринних органах; це має важливі наслідки для патогенезу захворювання та потенційної фармакотерапії. Молекулярна основа взаємозв'язку між макрофагами та ендокринними клітинами розкривається, що дозволяє ідентифікувати численні точки для фармакологічного втручання. Макрофаги є основними імунними клітинами яєчка, але їхнє походження, гетерогенність, розвиток вивчені недостатньо. Об'єкт і методи. Дослідження проводили на 20 дорослих самцях щурів. Тварин випадковим чином розподіляли на 2 групи: контрольну (10 тварин) та інтактну (10 тварин). Тваринам контрольної групи в стегно вводили фізіологічний розчин у дозі 0,3 мл. Підготовку матеріалу для електронно-мікроскопічного дослідження структур інтерстиціального простору яєчка проводили за загальноприйнятою методикою. Результати і обговорення. Ми ідентифікували дві популяції макрофагів, розташованих в інтерстиціальному просторі яєчок, враховуючи їх розташування та функціональну здатність. Результати наших досліджень показали, що під впливом центрального блокування синтезу ЛГ відбувається морфогенез антигенпрезентуючих клітин інтерстиціального простору яєчка, а саме макрофагів. Ці модифікації вказують на інверсію їх поляризації, що, у свою чергу, призводить до мікроскопічної реорганізації клітин, зокрема їх активації (M1) для виконання певної функціональної діяльності в органі. Висновки. На ранніх стадіях центрального блокування синтезу ЛГ виявлені метаболічні та функціональні порушення в паренхімі та стромі органу, що призводить до ознак ультраструктурного та функціонального напруження, яке проявлялось в кількісному зсуві популяції макрофагів в сторону збільшення перитубулярних макрофагів.

Ключові слова: яєчко, ЛГ, тестостерон, трипторелін, макрофаг, пристінковий макрофаг, електронна мікрофотографія, щур.

Дослідження є фрагментом наукового проекту «Експериментально-морфологічне вивчення дії дифереліну, етанолу та 1% метакрилової кислоти на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів» кроконсервованих трансплантатів плаценти, № державної реєстрації 0119U102925.

Макрофаги — це клітини вродженої імунної системи, які відіграють безліч ролей в організмі. Відомо, що макрофаги знаходяться в ендокринних залозах, і тепер є багато доказів того, що ці клітини тісно взаємодіють з ендокринними клітинами. Імуно-ендокринні взаємодії важливі для розвитку ендокринних залоз та їх функціонування під час фізіологічних станів, а також стають ключовими гравцями в патофізіологічних станах. Завдяки профілюванню експресії генів різноманітні субпопуляції тканинних макрофагів були виявлені в ендокринних органах; це має важливі наслідки для патогенезу захворювання та потенційної фармакотерапії. Макрофаги в жировій тканині та острівцях підшлункової залози є ключовими учасниками процесу метафламації (метаболічного запалення), що лежить в основі розвитку резистентності до інсуліну, метаболічного синдрому, цукрового діабету та неалкогольної жирової хвороби печінки. В яєчниках вони відіграють важливу роль у фолікулогенезі яєчників та овуляції, тоді як у чоловічому репродуктивному тракті вони регулюють сперматогенез шля-

хом регуляції стероїдогенезу клітинами Лейдига. Поєднуючи моделі картування *in vivo*, химерні та парабіотичні мишачі моделі з поглибленим клітинним аналізом, ми виявили, що популяції макрофагів CD64^{hi}MHCIII_{lo} та CD64^{hi}MHCII яєчка виникають послідовно з еритромієлоїдних попередників жовткового мішка, ембріонального кровотворення та новонароджених неонатальних моноцитів [4,6,9].

Тестикулярні макрофаги є найбільшою популяцією лейкоцитів у яєчку. Їх середовище характеризується, здавалося б, суперечливими потребами в толерантності до аутоантигенних зародкових клітин і здатності створювати прозапальні вроджені імунні відповіді проти вторгнення патогенів. Протягом останніх років було досягнуто значного прогресу в нашому розумінні того, як внутрішньоклітинні сигнальні події дозволяють тестикулярним макрофагам адекватно реагувати на запальні стимули зі здатністю виявляти патогени, але уникати надмірного пошкодження тканин для підтримки фертильності. Крім того, нові дані доповнюють наше розуміння того, що

тестикулярні макрофаги відіграють важливу роль у нормальному гомеостазі сім'яників [3,10]. Релізінг-гормони - це клас пептидних гормонів гіпоталамуса, загальною властивістю яких є реалізація їх ефектів через стимуляцію синтезу і секреції в кров тих або інших тропних гормонів передньої долі гіпофіза. Лютеїнізуючий гормон (ЛГ) - гонадотропний пептидний гормон передньої частки гіпофізу, є центральним регулятором, який контролює продукцію чоловічого статевого гормону – тестостерону, через систему «гіпофіз – яєчко» з активацією інтерстиційних ендокриноцитів - до продукції тестостерону, який в свою чергу стимулює ріст та розвиток клітин та тканин сім'яників. Тестостерон має значний вплив на функціональний стан макрофагів організму [2,7,8].

Молекулярна основа взаємозв'язку між макрофагами та ендокринними клітинами розкривається, що дозволяє ідентифікувати численні точки для фармакологічного втручання. Макрофаги є основними імунними клітинами яєчка, але їхнє походження, гетерогенність, розвиток вивчені недостатньо.

Мета дослідження

Вивчення електронномікроскопічних клітинних та субклітинних змін макрофагів сім'яників інтерстиційного простору при блокуванні ЛГ введенням триптореліну протягом 90 діб.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проводили на 25 статевозрілих самцях білих щурів. Щурів поділили на 2 групи по 10 тварин у кожній: контрольна група (I), група з центральною депривацією синтезу тестостерону – 15 тварин. Тваринам групи з центральною депривацією синтезу тестостерону підшкірно вводили триптореліну ацетат у дозі 0,3 мг діючої речовини на кг [5], а контрольній групі вводили фізіологічний розчин.

Експеримент тривав 90 діб. Тварини утримувалися в стандартних умовах віварію Полтавського державного медичного університету. Піддослідні тварини були умертвлені у суворій відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях»; (Страсбург, 1986), а також із «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», прийнятими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Після передозування кетаміну тварин декапітували, препаративні невеликі шматочки насінників фіксували в 2,5 % розчині глутаральдегіду (рН=7,2-7,4). Постфіксацію матеріалу проводили 1 % розчином оксиду осмію (IV) з подальшою

дегідратацією в пропіленоксиді та заливання зразка в суміш епоксидних смол. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікротомі, контрастували 1 % водним розчином уранілацетату та цитрату свинцю за методом Рейнольдса та досліджували за допомогою електронного мікроскопа [1].

Результати та обговорення

На основі результатів наших попередніх досліджень ми ідентифікували дві популяції макрофагів, розташованих в інтерстиціальному просторі сім'яників, враховуючи їх розташування та функціональну здатність, що було підтвержено гістологічно та біохімічно [11,12]. Оскільки ми не знайшли достатньої кількості літературних даних з цього питання, ми використовуємо термінологію, визначену раніше на перших етапах нашого дослідження. У загальній популяції макрофагів сім'яних каналців ми розрізняємо інтерстиціальні та пристінкові або перитубулярні макрофаги. В цьому дослідженні ми більш детально зупинимось на морфогенезі пристінкових макрофагів на ранніх термінах спостереження.

При дослідженні нами електроннограм 30-ї доби спостереження, нами було встановлено, що більшість клітин макрофагального пулу розташовувались ближче до звивистих сім'яних каналців. Ці клітини були в стадії функціональної напруги, що підтверджувалось наявністю фагоцитозу та наявності інфламасом в цитоплазмі клітин. При ультраскопічному дослідженні цих клітин нами візуально виявлялись клітини витягнутої форми, і вони нагадували клітини фібробластичного ряду, але повністю відрізнялись від них. Клітини витягнуті, зовні з великою кількістю псевдоподій, які щільно прилягали до сполучної мембрани звивистого каналця. Ядра великі, здебільшого плоскі, електронно-щільні, з переважанням гетерохроматину. Ядерна оболонка - щільна, двошарова, мала велику кількість пор. За кількістю хроматину в ядрах клітинну популяцію можна розділити на світлі та темні клітини. На нашу думку – це залежить від функціонального стану клітин в бік життєздатності. У більшості клітин зустрічаються світлі ядра. Ядерце одне, щільне.

Цитоплазма клітин мала невеликі розміри, світла, присутня добре розвинена ендоплазматична сітка з численними рибосомами, присутні полісоми. Також у цитоплазмі клітин була велика кількість лізосом різного розміру та електронної щільності. Мітохондрії овальної форми, з осмофільним матриксом і невеликою кількістю крист (рис. 1).

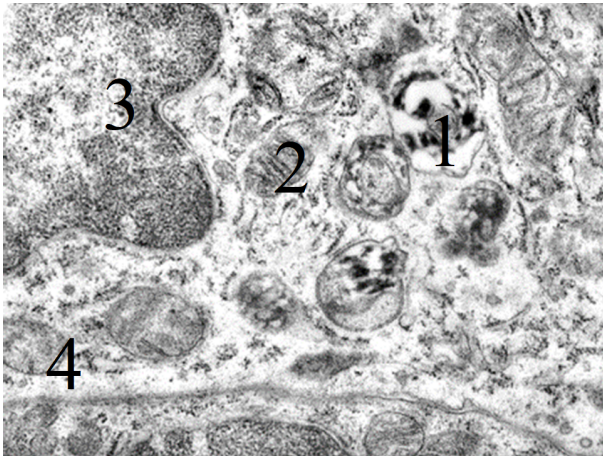


Рис. 1 – Електроннограма перитубулярного макрофагу на 30-ту добу при центральному блокуванні ЛГ триптореліном. Збільшення $\times 14000$. 1- інфламосома, 2 – мітохондрія, 3 – ядро макрофага, 4 – лізосоми.

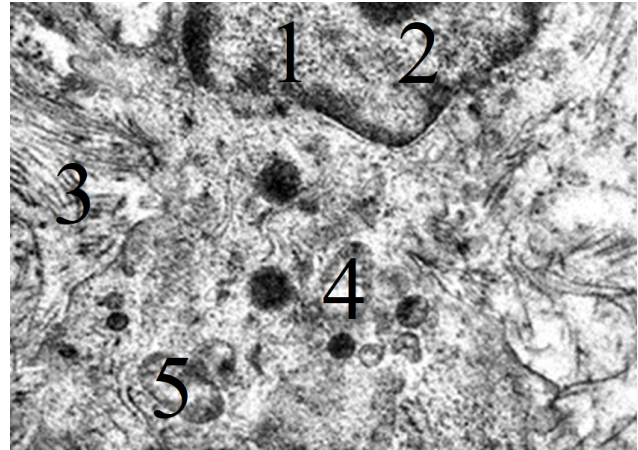


Рис. 2 – Електроннограма перитубулярного макрофагу на 90-ту добу при центральному блокуванні ЛГ триптореліном. Збільшення $\times 12000$. 1- ядро макрофага, 2 – ядрець, 3 – стінка звуженого каналця, 4 – лізосоми, ліпідні включення.

90-та доба спостереження характеризувалась збільшенням популяції клітин пристінкових в порівнянні як з контрольною групою тварин, так і з попереднім терміном дослідження. Їх кількість, збільшилась на 25% порівняно з 30-ю добою. Клітини мали сплющене ядро витягнутої, овальної, іноді плоскої форми з одним ядрецем, каріолема - електронно-щільна, каріоплазма неоднорідна. Хроматин – з переважанням гетерохроматину. Цитоплазма - світла та займала невелику частину клітини. На поверхні клітин є велика кількість псевдоподій та інвагінації. У цитоплазмі знаходилась велика кількість лізосом, функціонально активних, що відрізнялися за розміром і електронною щільністю. Мітохондрії невеликі, з осмофільним матриксом і невеликою кількістю крист.

Висновки

На ранніх стадіях центральної блокування синтезу ЛГ виявлені метаболічні та функціональні порушення в паренхімі та стромі органу, що призводить до ознак ультраструктурного та функціонального напруження, яке проявлялось в кількісному зсуві популяції макрофагів в сторону збільшення перитубулярних макрофагів.

References

1. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. *Metodyky morfolohichnykh doslidzhen*. Bahriy M.M., Dibrova V.A. redaktory. Vinnytsya: Nova knyha; 2016. 328s. (Ukrainian).

Summary

ELECTRON MICROSCOPIC CHANGES OF PERITUBULAR MACROPHAGES OF RAT TESTIS UNDER CONDITIONS OF CENTRAL BLOCKAGE OF LUTEINIZING HORMONE SYNTHESIS BY TRIPTORELIN DURING 90 DAYS OF OBSERVATION.

Stetsuk E.V., Shepitko V.I., Boruta N.V., Pelypenko L.B., Voloshina O.V.

Key words: testis, LH, testosterone, triptorelin, macrophage, parietal macrophage, electron micrograph, rats.

Introduction. Macrophages are cells of the innate immune system that play many roles in the body. Macrophages are known to be found in endocrine glands, and there is now much evidence that these cells interact closely with endocrine cells. Immune-endocrine interactions are important for the development of endocrine glands and their functioning during physiological states, and also become key players in pathophysiological states. Through gene expression profiling, diverse subpopulations of tissue macrophages have been identified in endocrine organs; this has important implications for disease pathogenesis and potential pharmacotherapy. The molecular basis of the relationship between macrophages and endocrine

2. Rehman A, Pacher P, Haskó G. Role of Macrophages in the Endocrine System. *Trends Endocrinol Metab*. 2021 Apr;32(4):238-256.
3. Almeida S, Rato L, Sousa M, et al. Fertility and sperm quality in the aging male. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(30): 4429-4437.
4. Atallah A, Mhaouty-Kodja S, Grange-Messent V. Chronic depletion of gonadal testosterone leads to blood-brain barrier dysfunction and inflammation in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017; 37(9): 3161-3175.
5. Botté MC, Lerrant Y, Lozach A, et al. LH down-regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor, but not GnRH, mRNA levels in the rat testis. *J Endocrinol*. 1999; 162(3): 409-415.
6. Lokka E, Lintukorpi L, Cisneros-Montalvo Sh, et al. Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. *Nat Commun*. 2020. 11: 4375.
7. Hotta Y, Kataoka T, Kimura K. Testosterone Deficiency and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide, Asymmetric Dimethylarginine, and Endothelial Progenitor Cells. *Sex Med Rev*. 2019; 7(4): 661-668.
8. Merseburger AS, Hupe MC. An update on triptorelin: current thinking on androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Adv Ther*. 2016; 33(7): 1072-93.
9. Ming W, Yalong Y, Dilay C, et al. Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. 2021 Jan 5;118(1):e2013686117.
10. Mossadegh-Keller N, Sieweke MH. Testicular macrophages: Guardians of fertility. *Cell Immunol*. 2018; 330: 120-125.
11. Stetsuk YeV, Akimov OYe, Shepitko KV, 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; 70(4): 228-233.
12. 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; 71(1): 226-231.

cells is being revealed, allowing the identification of numerous points for pharmacological intervention. Macrophages are the main immune cells of the testis, but their origin, heterogeneity, and development have not been sufficiently studied.

Object and methods. The study was conducted on 20 adult male rats. Animals were randomly divided into 2 groups: control (10 animals) and intact (10 animals). Animals of the control group were injected with physiological solution in a dose of 0.3 ml. Preparation of material for electron microscopic examination of the structures of the interstitial space of the testis was carried out according to the generally accepted method.

Results and discussion. We identified two populations of macrophages located in the interstitial space of the testes, considering their location and functional capacity. The results of our research showed that under the influence of central blocking of LH synthesis, the morphogenesis of antigen-presenting cells of the interstitial space of the testis, namely macrophages, occurs. These modifications indicate an inversion of their polarization, which, in turn, leads to a microscopic reorganization of cells, in particular their activation (M1) to perform certain functional activities in the organ.

Conclusions. In the early stages of central blocking of LH synthesis, metabolic and functional disorders were detected in the parenchyma and stroma of the organ, which led to signs of ultrastructural and functional stress, which manifested itself in a quantitative shift of the macrophage population in the direction of an increase in peritubular macrophages.

DOI 10.31718/2077-1096.23.2.2.55

УДК 612.82:599.323.4:577.115:612.08

Френкель Ю.Д., Зюзін В.О., Черно В.С.

ВПЛИВ КУРКУМІНУ НА ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЦІЛОДОБОВОГО ОСВІТЛЕННЯ ТА ВИСОКОКАЛОРИЙНОЇ ВУГЛЕВОДНО-ЛІПІДНОЇ ДІЄТИ

Чорноморський національний університет імені Петра Могили, м. Миколаїв

Метою дослідження була оцінка впливу поліфенолу куркуміну на перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) у гомогенаті великих півкуль головного мозку щурів за їх цілодобового освітлення (ЦО) та утримання на висококалорійній вуглеводно-ліпідній дієті (ВКВЛД). Експерименти були виконані на 21 білих щурах-самцях лінії Вістар (n=21) масою 210-250 г, розподілених на 3 групи по 7 тварин. Щурів 1-ї групи (контроль I) утримували на стандартному раціоні віварію та рівному чергуванні періодів світла та темряви. Тваринам 2-ї та 3-ї груп протягом часу ЦО на тлі ВКВЛД щоденно вводили внутрішньошлунково через зонд 1 мл 20 %-й водного розчину фруктози («плацебо», контроль II) та куркумін у дозі 200 мг/кг відповідно. Рівень ПОЛ у гомогенаті великих півкуль головного мозку оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) забарвленого триметінового комплексу. Знаходження щурів на ЦО та ВКВЛД супроводжувалося вірогідним зростанням концентрації ТБК-реактантів до та після інкубації в прооксидантному буферному розчині на 59.0 та 68.8% відповідно. Введення куркуміну за умов експерименту значно зменшувало концентрацію ТБК-активних продуктів: до його інкубації в прооксидантному буферному розчині – на 24.4%, після інкубації – на 31.0% порівняно з відповідними значеннями 2-ї групи. Зроблено висновок, що введення поліфенолу куркуміну за умов ЦО щурів та утримання їх на ВКВЛД істотно обмежує розвиток ПОЛ у гомогенаті великих півкуль головного мозку.

Ключові слова: поліфеноли, куркумін, перекисне окиснення ліпідів, оксидативно-нітрозативний стрес, метаболічний синдром, цілодобове освітлення, висококалорійна вуглеводно-ліпідна дієта, головний мозок, щури.

Вступ

Нещодавно було показано, що і порушення світлового режиму, і висококалорійна вуглеводно-ліпідна дієта (ВКВЛД) викликають притаманні метаболічному синдрому розлади обміну речовин, ендотеліальну дисфункцію, системну запальну відповідь та оксидативно-нітрозативний стрес [1]. Все це ініціює інтенсивний спалах перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у організмі ссавців, у тому числі у великих півкулях головного мозку [2].

Згідно з нашими попередніми спостереженнями, введення щурам за умов моделювання метаболічного синдрому, індукованого цілодобовим освітленням (ЦО) та ВКВЛД, біофлавоно-

їдів – епігалокатехіну-3-галату (EGCG) та кверцетину – суттєво обмежує ознаки оксидативно-нітрозативного стресу в головному мозку [2] та печінці [3]. Така дія цих сполук останнім часом розглядається через їх здатність модулювати редокс-чутливі транскрипційні фактори NF-κB і з Nrf2 [4-6].

За сучасними уявленнями, поліфенол куркумін ((1E,6E)-1,7-біс(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-1,6-гептадієн-3,5-діон) також здатний впливати на активність низки транскрипційних чинників: NF-κB, Nrf2, AP-1, PPAR-γ та ін. [7, 8]. Зокрема куркумін порушує фосфорилування IκB через пригнічення IκB-кіназного комплексу [9]. Доведено його здатність індукувати сигнальний шлях Nrf2 / антиоксидант-респонсивний елемент