

© Ю. С. Храмова, Н. В. Тюменцева, Б. Г. Юшков, М. А. Жиликова, 2018
УДК 591.82:591.463.2:616.8-008.615:599.323.4

Ю. С. Храмова^{1, 2}, Н. В. Тюменцева¹, Б. Г. Юшков^{1, 2}, М. А. Жиликова²

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК СЕМЕННИКОВ НА СТРЕСС РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

¹ Лаборатория иммунофизиологии и иммунофармакологии (зав. — чл.-кор. РАН проф. Б. Г. Юшков),
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук;

² Департамент биологии и фундаментальной медицины, ФGAOU BO «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», г. Екатеринбург

Цель — изучить структурные изменения тучных клеток семенников крыс в ответ на воздействие стрессорных факторов разной интенсивности.

Материал и методы. Изучали семенники 20 половозрелых крыс-самцов линии Вистар, подвергнутых стрессогенному воздействию физических нагрузок разной интенсивности. Определяли число тучных клеток в семенниках, их синтетическую и функциональную активность, производили оценку сперматогенеза по ряду показателей.

Результаты. Нагрузки умеренной интенсивности не вызывают изменений морфофункционального состояния тучных клеток семенников и не приводят к каким-либо нарушениям сперматогенеза, что свидетельствует о появлении адаптационной реакции тренировки. Длительные нагрузки высокой интенсивности приводят к уменьшению числа тучных клеток, снижению их синтетической активности, а при краткосрочных нагрузках максимальной интенсивности — к снижению функциональной активности тучных клеток.

Выводы. Нагрузки высокой и максимальной интенсивности вызывают изменения морфофункциональных показателей тучных клеток в семенниках крыс-самцов и препятствуют нормальному функционированию семенных канальцев, оказывая ингибирующее действие на половую функцию.

Ключевые слова: семенник, тучные клетки, сперматогенез, стресс

Бесплодие — не только важная медицинская, но и серьезная социальная проблема. Согласно международным исследованиям, с проблемой бесплодия сталкиваются от 15 до 20 % пар, при этом в половине случаев это связано с нарушением репродуктивного здоровья мужчин. Несмотря на совершенствование методов клиничко-лабораторного обследования пациентов и разработку новых методов их лечения, нарушения фертильности мужчин не имеют тенденции к снижению [1, 4]. В качестве факторов, способствующих данной патологии, рассматриваются и стрессорные факторы, к числу которых относят и физические нагрузки.

Становится все более очевидным, что влияние иммунной системы на функции гонад существует. К иммунорегуляторным клеткам относятся тучные клетки (ТК). Они составляют гетерогенную клеточную популяцию, отличающуюся по структурно-функциональным свойствам в разных органах и тканях [3, 5, 6, 9, 13]. В норме число ТК в семенниках весьма ограничено, и в основном эти клетки находятся в области семенной капсулы вокруг субкапсулярных кро-

веносных сосудов [8, 11]. Их количество варьирует в зависимости от возраста [10]. Известно, что у бесплодных лиц отмечается значительное возрастание числа ТК [15]. В физиологических условиях участие ТК в регенерации яичка обеспечивается различными механизмами, модулирующими стероидогенез. Известно, что у хомяков выработку тестостерона стимулирует гистамин, в то время как фактор некроза опухолей-α и серотонин ингибируют тестикулярный стероидогенез. Наличие вазоактивных веществ в ТК, а также преимущественное расположение вокруг кровеносных сосудов предполагает их вовлечение и в регуляцию кровотока [7, 12]. Относительно низкое число и ограниченное распространение ТК в нормальных семенниках, как полагают, является одной из основных особенностей иммунной привилегии [14]. Известно, что физиологическая активность ТК меняется при стресс-реакциях. Однако при всем объеме существующей информации нет подробного исследования, касающегося роли ТК в регуляции восстановительных процессов семенника после стресса.

Сведения об авторах:

Храмова Юлия Сергеевна (e-mail: hramtova15@mail.ru), Тюменцева Наталья Валерьевна, Юшков Борис Германович,
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

Жиликова Мария Андреевна, Департамент биологии и фундаментальной медицины, ФGAOU BO «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

В связи с этим цель настоящего исследования — изучение реакции ТК семенников на стрессовые факторы разной интенсивности.

Материал и методы. Исследовали семенники 20 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 370–520 г. Условия содержания и обращение с животными соответствовали Директиве Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, которых используют для научных целей» (2010/63/EU). В качестве стресс-воздействия использовали плавание — дозированную физическую нагрузку, вызывающую стресс у крыс. На проведение данного экспериментального исследования получено разрешение локального этического комитета Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (протокол № 10 от 03.06.2016 г.).

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы, подвергавшиеся нагрузкам разной интенсивности: 1) интактные крысы ($n=5$); 2) крысы, которых подвергали 6-дневному плаванию в течение 2 ч на протяжении 4 нед (умеренная интенсивность нагрузки, $n=5$); 3) крысы, подвергавшиеся 5-дневному 6-часовому плаванию на протяжении 4 нед по схеме — 3 подхода по 2 ч с 30-минутным отдыхом (нагрузка высокой интенсивности, $n=5$); 4) крысы, которых подвергали 6-дневному плаванию с грузом 20 % от массы тела на протяжении 4 нед по схеме — 5 подходов по 60 с с 3-минутным отдыхом (нагрузка максимальной интенсивности, $n=5$).

Животных выводили из эксперимента через 4 нед путем передозировки эфирного наркоза. Для гистологического исследования семенники фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. После стандартной гистологической проводки на автомате закрытого типа Shandon Excelsior (MICROM International GmbH, Германия) семенники заливали в парафин с помощью станции для заливки биологических тканей EG 1160 (Leica, Германия). Полученные парафиновые блоки нарезают на полуавтоматическом микротоме Thermo scientific Microm HM 450 (MICROM International GmbH, Германия), толщина срезов составляла 4–5 мкм.

Для морфометрических исследований препараты окрашивали гематоксилином — эозином, ТК выявляли толуидиновым синим. С помощью светового микроскопа Leica DFC 420 (Leica, Германия) производили оценку сперматогенеза по следующим показателям: средний индекс сперматогенеза, среднее число сперматогоний в канальце, диаметр семявыносящего канальца, площадь поперечного сечения семенного канальца, количество нефункционирующих канальцев. Индекс сперматогенеза J рассчитывали на поперечном срезе семенника по 4-балльной системе (с учетом количества слоев эпителиальных клеток в каждом канальце). Средний индекс сперматогенеза J определяли по формуле: $J = \Sigma a/A$, где a — количество рядов эпителиосперматогенного слоя, A — количество подсчитанных канальцев.

Подсчет ТК в семенниках проводили на единицу площади с пересчетом на 1 мм^2 . Для оценки синтетической активности ТК подразделяли на 4 типа. К 1-му типу относили клетки с малым содержанием гранул секрета в цитоплазме, который располагался околосембранно. Тип 2 включал клетки с хорошо дифференцированной гранулярностью в цитоплазме и диффузным расположением гранул. К типу 3 относили крупные клетки с плотным и диффузным расположением гранул в цитоплазме. К нулевому типу относили дегранулированные клетки с признаками нарушения целостности цитоплазматической мембраны и выделения в окружающее

тканевое пространство цитоплазматических гранул. Для определения синтетической активности вычисляли средний гистохимический коэффициент (СГК) по формуле: $\text{СГК} = (3n + 2n + 1n + 0n)/100$, где $3n$, $2n$, $1n$ и $0n$ — соответственно число клеток типа 3, 2, 1 или 0 согласно классификации, приведенной выше, 100 — общее число подсчитанных клеток в группе. Для оценки функциональной активности по выбросу гранул ТК в межклеточное пространство использовали индекс дегрануляции (ИД, %), который рассчитывали по формуле: $\text{ИД} = D/(D+N) \times 100$, где D — число ТК с явными признаками дегрануляции, N — число неактивированных ТК.

Концентрацию тестостерона в крови определяли методом иммуноферментного анализа на автоматическом фотометре (BioTek ELx 808, США) с помощью набора реагентов (Тестостерон-Имаксиз, Россия).

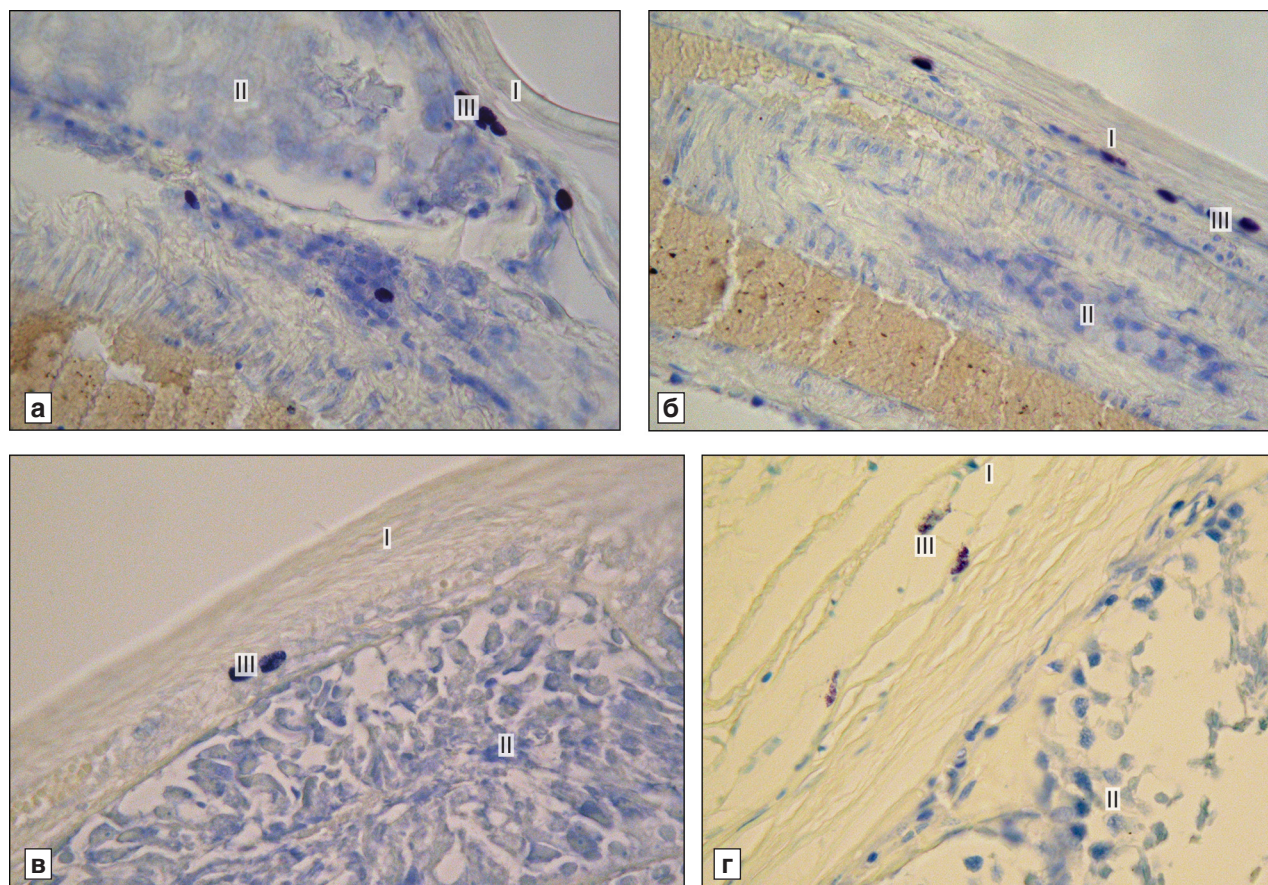
Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Past 3.15 и Statistica 8.0. Значимость различий между сравниваемыми группами определяли с использованием критериев Фридмана, Краскела—Уоллиса, Манна—Уитни при $p < 0.05$.

Результаты исследования. В извитых семенных канальцах семенников интактной группы животных обнаруживались все типы клеток сперматогенного слоя, а также клетки Сертоли. На препаратах семенников ТК удалось выявить, используя толуидиновый синий. ТК в семенниках интактных крыс имели овальную форму и располагались исключительно в оболочке. Этих клеток мало, и они обладали небольшой функциональной активностью (рисунк, а).

У крыс после нагрузки умеренной интенсивности не выявляли изменений в коэффициентах массы семенников. Почти все исследуемые показатели сперматогенеза оставались на уровне интактных животных, однако наблюдалось значимое увеличение среднего числа нормальных сперматогоний, относящихся к пулу стволовых клеток и участвующих в формировании 2-, 3-го и 4-го рядов эпителиосперматогенного слоя. Концентрация тестостерона в крови самцов после исследуемого типа нагрузки достоверно не изменялась.

Между показателями ТК семенников интактных крыс и группы животных после умеренной нагрузки различия не наблюдались (таблица).

ТК были представлены преимущественно клетками 3-го типа (см. рисунок, б). После высокоинтенсивной нагрузки у крыс отмечали значимое снижение среднего индекса сперматогенеза по сравнению с контролем, что явилось следствием повреждений эпителиосперматогенного слоя. Среднее число нормальных сперматогоний незначительно снижалось вследствие нарушений в пуле стволовых клеток яичка, были выявлены единичные нефункционирующие канальцы, отмечалось снижение концентрации тестостерона в крови. По данным морфометрии, число ТК



Тучные клетки в семенниках крыс при нагрузках различной интенсивности.

а — интактные животные; б — умеренная нагрузка; в — высокая интенсивность нагрузки; г — максимальная интенсивность нагрузки. I — собственная оболочка извитого семенного канальца; II — эпителиосперматогенный слой; III — тучные клетки. Окраска толуидиновым синим. Ув. 40

Характеристика ТК семенника крыс, подвергшихся физической нагрузке разной интенсивности

Группы животных	Число ТК в семеннике на 1 мм ²	Средний гистохимический коэффициент ТК семенника, %	Индекс дегрануляции ТК семенника, %
Интактные животные	51,5±3	2,2±0,1	5,8±1,7
Животные с умеренной нагрузкой	23,1±10,5	2,1±0,2	6,75±2,7
Животные с высокой нагрузкой	4,4±2,1*	0,6±0,4* [#]	15,2±9,6
Животные с максимальной нагрузкой	31,5±10,5	1,23±0,3*	44,4±14,3* [#]

* Значимость различий с интактной группой при $p < 0,05$; [#] значимость различий с группой животных с умеренной нагрузкой при $p < 0,05$.

в яичках крыс, подвергшихся нагрузке высокой интенсивности (см. рисунок, в), а также гистохимический коэффициент в среднем снижались по сравнению с интактной группой, тогда как индекс дегрануляции оставался без изменений (см. таблицу). Коэффициент массы семенников не отличался у крыс интактной группы и группы после нагрузки максимальной интенсивности. В то же время, у экспериментальной группы животных обнаруживалось значимое снижение среднего индекса сперматогенеза, указывающее на ухудшение репродуктивной функции самцов. Однако диаметр семенных канальцев и спер-

матоцитограмма свидетельствовали о том, что эти изменения не критичны для мужской половой системы. Значимых различий в концентрации тестостерона нет, однако тенденция к снижению, имеющая место уже при умеренной нагрузке, сохранялась. В среднем у крыс после нагрузки максимальной интенсивности (см. рисунок, г) значительно снижался гистохимический коэффициент и увеличивался индекс дегрануляции ТК в семенниках, тогда как среднее число ТК в 1 мм² оставалось без изменений (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Полученные нами данные свидетельствуют о том,

что у крыс при стрессе в виде умеренных физических нагрузок морфофункциональные показатели сперматогенеза незначительно отличаются от таковых в интактной группе, изменения в тучноклеточной популяции семенников не наблюдаются, а функций репродуктивной системы самцов сохраняются. Это соответствует известным данным о том, что при умеренных многократных воздействиях развивается адаптивная реакция, что, в конечном счете, приводит к резистентности организма к данному раздражителю [2].

При продолжительных нагрузках высокой интенсивности отмечается ухудшение генеративной функции семенников, проявляющееся в уменьшении индекса сперматогенеза, числа нормальных сперматогоний и появлении нефункционирующих пустых канальцев. Одновременно с этим наблюдается снижение числа ТК и их синтетической активности в семенниках. Последнее, вероятно, является результатом ингибирующего влияния гормонов стресса (катехоламинов и кортикостероидов) на ТК. Снижение числа ТК может быть обусловлено их перераспределением в организме в результате миграции к наиболее интенсивно работающим в данный момент органам и усилением регулирующего влияния ТК в них. Однако последнее предположение требует специального изучения.

При краткосрочных физических нагрузках максимальной мощности, вызывающих повышенный стресс для организма, наблюдается ухудшение сперматогенеза, наряду с этим число ТК в семенниках не изменяется, однако резко возрастает их функциональная активность. Клетки начинают активно дегранулировать. Такая реакция ТК в яичках крыс после нагрузки максимальной интенсивности, вероятно, связана с модулирующим влиянием их на стероидогенез, а также регуляцией кровотока в изучаемом органе.

Таким образом, умеренные физические нагрузки, ведущие к формированию долговременных адаптационных реакций, не вызывают изменений сперматогенеза и ТК в семенниках, тогда как излишне напряженные тренировки, характеризующиеся как нагрузки максимальной интенсивности, приводят к срыву адаптации и препятствуют нормальному функционированию семенных канальцев. Отмеченные изменения при длительных нагрузках высокой интенсивности протекают на фоне уменьшения как числа ТК, так и их синтетической активности, а при краткосрочных нагрузках максимальной интенсивности — только на фоне снижения функциональной активности ТК.

Работа выполнена в рамках программы УрО РАН «Фундаментальные науки — медицине» № 15-3-4-24.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Ю. С. Х., Н. В. Т.

Сбор и обработка материала: Ю. С. Х., Н. В. Т., М. А. Ж.

Статистическая обработка данных: Ю. С. Х., Н. В. Т., М. А. Ж.

Анализ и интерпретация данных: Ю. С. Х., Н. В. Т., Б. Г. Ю.

Написание и редактирование текста: Ю. С. Х., Н. В. Т., Б. Г. Ю.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гамидов С., Авакян А. Идиопатическое бесплодие у мужчин: эпидемиология, этиология, патогенез, лечение // Врач. 2013. № 7. С. 2–4 [Gamidov S., Avakyan A. Idiopathic male infertility: epidemiology, etiology, pathogenesis, treatment // Vrach. 2013. № 7. P. 2–4. In Russ.].
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д: Изд-во Ростовск. ун-та, 1990. 224 с. [Garkavi L. Kh., Kvakina E. B., Ukolova M. A. Adaptational reactions and resistance of the organism. Rostov on Don: Izdatel'stvo Rostovskogo universiteta, 1990. 224 p. In Russ.].
3. Ерохина И.Л., Оковитый С.В., Казаченко А.А., Куликов А.Н., Емельянова О.И., Быстрова О.А. Резкое увеличение плотности тучных клеток в легких и перикарде при индуцированной монокроталином легочной гипертензии у крыс // Цитология. 2011. № 1. С. 39–43 [Erokhina I. L., Okovityi S. V., Kazachenko A. A., Kulikov A. N., Emel'yanova O. I., Byistrova O. A. A sharp increase in the density of pulmonary and pericardial mast cells under monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats // Tsitologiya. 2011. № 1. P. 39–43. In Russ.].
4. Щеплев П.А., Аполихин О.И. Мужское бесплодие. Обсуждение консенсуса // Вестник репродуктивного здоровья. 2010. № 3–4. С. 37–44 [Shcheplev P. A., Apolikhin O. I. Male infertility. Discussion of consensus // Vestnik reproduktivnogo zdorov'ya. 2010. № 3–4. P. 37–44. In Russ.].
5. Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г., Арташян О.С. Тучные клетки. Физиология и патофизиология. М.: Медицина, 2011. 240 с. [Yushkov B. G., Chereshev V. A., Klimin V. G., Artashyan O. S. Mast cells. Physiology and pathophysiology. M.: Meditsina, 2011. 240 p. In Russ.].
6. Яковлева Л.М., Соркина О.А. Реакция тучных клеток в околоушной слюнной железе на хроническую алкогольную интоксикацию // Морфология. 2016. Т. 149, вып. 2. С. 27–31 [Yakovleva L. M., Sorkina O. A. Reaction of parotid gland mast cells to chronic alcohol intoxication // Morfologiya. 2016. Vol. 149, № 2. P. 27–31. In Russ.].
7. Anton F., Morales C., Aguilar R., Bellido C., Aguilar E. A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis // J. Vet. Med. Ser. A. 1998. Vol. 45, № 4. P. 209–218. Doi: 10.1111/j.1439-0442.1998.tb00819.x
8. Apa D. D., Cayan S., Polat A., Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility // Arc. Androl. 2002. Vol. 48, № 5. P. 337–344.
9. Beghdadi W., Madjene L. C., Benhamou M., Charles N., Gautier G., Launay P., Blank U. Mast cells as cellular sensors

- in inflammation and immunity // *Front. Immunol.* 2011. Vol. 2, № 37. P. 1–15. Doi:10.3389/fimmu.2011.00037.
10. Fijak M., Meinhardt A. The testis in immune privilege // *Immunol. Rev.* 2006. Vol. 213, № 1. P. 66–81. Doi: 10.1111/j.1600–065X.2006.00438.x
 11. Hedger M. P. Testicular leukocytes: what are they doing? // *Rev. Reprod.* 1997. Vol. 2, № 1. P. 38–47. Doi:10.1530/ror.0.0020038.
 12. Hussein M. R., Abou-Deif E. S., Bedaiwy M. A. Said T. M., Mustafa M. G., Nada E., Ezat A., Agarwal A. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis // *Fertil. Steril.* 2005. Vol. 83, № 5. P. 1447–1453. Doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.062.
 13. Krystel-Whittemore M., Dileepan K. N., Wood J. G. Mast cell: a multi-functional master cell // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 6. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00620.
 14. Li N., Wang T., Han D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis // *Front. Immun.* 2012. Vol. 3. P. 1–12. Doi: 10.3389/fimmu.2012.00152.
 15. Meineke V., Frungieri M. B., Jessberger B., Vogt H.-J., Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men // *Fertil. Sterility.* 2000. Vol. 74, № 2. P. 239–244. Doi: 10.1016/S0015-0282(00)00626-9.

Поступила в редакцию 10.10.2017
Получена после доработки 08.11.2017

REACTION OF TESTICULAR MAST CELLS TO STRESS OF DIFFERENT INTENSITY

Yu. S. Khramtsova^{1, 2}, *N. V. Tyumentseva*¹,
B. G. Yushkov^{1, 2}, *M. A. Zhilyakova*²

Objective — to study structural changes in mast cells of rat testes of in response to exposure to stressors of different intensity.

Material and methods. Testes were studied of 20 adult male Wistar rats, subjected to stressful influence of physical loads of different intensity. Mast cells numbers in the testes, their synthetic and functional activity were measured. At the same time, spermatogenesis activity was evaluated on the basis of several criteria.

Results. Loads of moderate intensity had no effect on the morpho-functional state of testicular mast cells and didn't not lead to any disturbances of spermatogenesis, indicating the appearance of training adaptive response. Prolonged exercises of high intensity lead to a decrease in the number of mast cells, reduction of their synthetic activity. Short-term loads of maximum intensity resulted in the decrease of mast cell functional activity.

Conclusions. Loads of high and maximal intensity caused changes in morphological and functional parameters of mast cells in the testes of male rats and impeded normal functioning of the seminiferous tubules, providing an inhibitory effect on their sexual function.

Key words: *testes, mast cells, spermatogenesis, stress*

¹ Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Ural Branch of RAS Institute of Immunology and Physiology, 106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg 620049; ² Department of Biology and Fundamental Medicine, Ural Federal University, 19 Mira Str., Yekaterinburg 620002