УДК 591.463.05: 678.048:616-003.96

СУСТЕНТОЦИТЫ, ИЛИ КЛЕТКИ СЕРТОЛИ КРЫС В ДИНАМИКЕ АДАПТАЦИИ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ ПО ДАННЫМ УЛЬТРАСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

САЯПИНА Ирина Юрьевна, *ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России*
ТРУШ Наталья Владимировна, *Дальневосточный государственный аграрный университет*
МАНДРО Николай Михайлович, *Дальневосточный государственный аграрный университет*
ЧУБИН Алексей Николаевич, *Ветеринарный центр*

Представлены результаты ультраструктурного анализа сустентоцитов крыс на этапах адаптации организма животных к низким температурам. Методом трансмиссионной электронной микроскопии было установлено, что в популяции сустентоцитов появляются клетки с ультраструктурными признаками функционального напряжения, направленными на поддержание секреторной функции. В сустентоцитах наблюдаются гиперплазия и дилатация элементов гладкой эндоплазматической сети, которые появляются после 1-й недели и достигают манифестации к 4-й неделе адаптации. После 4 недель адаптации в некоторых сустентоцитах наблюдаются ультраструктурные признаки истощения в виде вакуолизации цитоплазмы, просветления клеточного матрикса, накопления миелиноподобных структур, уменьшения количества митохондрий. Обнаруженные ультраструктурные изменения функциональной активности сустентоцитов могут быть причиной нарушений сперматогенеза, сопровождающихся потерей герминативных клеток.

Введение. Равновесное состояние между окружающей средой и живыми организмами, сформировавшееся в процессе эволюции, обеспечивает их нормальное функционирование и воспроизводство. Влияние природных факторов среды на животных возрастает по мере удаления от экватора к северу и югу. Среди природных факторов заслуживают внимание экстремальные, или дестабилизирующие факторы, способные оказывать патогенное действие на организм животных.

Одним из дестабилизирующих природных факторов в районах Сибири и Дальнего Востока являются низкие сезонные температуры. Максимальное функциональное напряжение организм животных испытывает в период адаптации к низким температурам. В связи с этим изучение морфологических аспектов адаптации репродуктивной системы животных к низким температурам является актуальным направлением биологических исследований.

Ранее нами было установлено, что при адаптации к низким температурам в яичках крыс обнаруживаются цитологические нарушения сперматогенеза с потерей герминативных клеток, уменьшение диаметра извитых семенных канальцев в совокупности со снижением уровня сывороточного тестостерона [1]. Известно, что герминативные клетки лишены рецепторов к андрогенам, основным трансдуктором эффектов тестостерона, обеспечивающих их жизнеспособность и развитие, являются клетки Сертоли [3, 5, 12]. Так как эффекты тестостерона в отношении сперматогенеза реализуются опосредованно, через секреторные продукты клеток Сертоли, многие авторы сходятся во мнении, что нарушения сперматогенеза являются следствием угнетения функциональной активности сустентоцитов [4, 5, 6, 9, 10, 11]. Морфологическое исследование клеток Сертоли на светооптическом уровне не объясняет обнаруженные ранее изменения сперматогенеза [1].

Цель работы – изучить ультраструктурные особенности сустентоцитов крыс и их роль в структурном и секреторном обеспечении сперматогенеза в динамике адаптации организма животных к низким температурам.

Методика исследований. Исследование было проведено на 100 нелинейных половозрелых белых крысах-самцах с массой тела 200–250 г. Интактные животные, которые содержались в стандартных температурных условиях вивария, составили группу контроля. Крыс экспериментальных групп охлаждали при температуре –15 °С по 3 ч ежедневно в течение 7, 14 и 28 дней соответственно. На следующий день после окончания охлаждения крыс выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом.

Для электронной микроскопии образцы ткани яичек фиксировали в 2,5%-м растворе глютаральдегида с постфиксацией в 1%-м растворе осмиевой кислоты, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы после контрастирования раствором уранилацетата и цитрата свинца изучали на трансмиссионном электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit TWIN (FEI Company, Нидерланды).

Исходя из важной роли оксида азота, синтез которого обеспечивает фермент NO-синтетаза, в регуляции сперматогенеза у крыс [3, 7, 8], на парафиновых срезах яичек при помощи моноклональных антител (Lab Vision, США) выявляли

индуцибельную NO-синтетазу, постановку иммуногистохимической реакции проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Активность иммуногистохимической реакции оценивали количественным методом по оптической плотности продуктов реакции с использованием программного обеспечения для количественного анализа ВидеоТесТ – Морфология 5.0.

Для статистической обработки количественных данных использовали программное обеспечение Statistica 6.0, выборки сравнивались при помощи t-критерия Стьюдента, различия считались значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследований. У крыс из группы контроля (рис. 1) ядра сустентоциов, расположенные в базальной части клеток, имеют гомогенную нуклеоплазму; кариолемма имеет четкие контуры. В цитоплазме сустентоцитов можно визуализировать митохондрии, форма которых определяется плоскостью среза (рис. 1, рис. 2, Б).

Для митохондрий характерно наличие матрикса с высокой электронной плотностью, на фоне которого хорошо контрастируются везикулярные кристы в виде светлых и круглых пузырьков. Гранулярная эндоплазматическая сеть представлена уплощенными мембранными цистернами, профили которых покрыты рибосомами, элементы гладкой эндоплазматической сети обнаруживаются в виде мембранных пузырьков, имеются многочисленные лизосомы (см. рис. 1, рис. 2, Б). Элементы цитоскелета обнаруживаются во всех участках цитоплазмы клеток Сертоли, с преобладанием в апикальных фрагментах, куда погружены головки созревающих сперматид, фиксированные посредством тубулобульбарного комплекса (см. рис. 2, Б), и в зонах специализированных контактов (см. рис. 2, А). Специализированные контакты Сертоли-Сертоли разделяют пространство извитых семенных канальцев на два компартмента. По ходу контактов обнаруживаются зоны эктоплазматической специализации, выполняющие изолирующую функцию. Из включений в цитоплазме сустентоцитов присутствуют розетки гликогена, в базальных отделах цитоплазмы содержится умеренное количество липидных капель (см. рис. 1, рис. 2, Б).

Иммуногистохимическая реакция на NO-синтетазу показала, что в яичках крыс иммунопозитивные свойства проявляет сперматогенный эпителий, представленный сперматогенными клетками и сустентоцитами. Оптическая плотность продуктов реакции составляет 0,305±0,005 усл. ед.

Рассматривая ультраструктурную организацию клеток Сертоли крыс экспериментальных групп, необходимо отметить, что на всех сроках адаптации в сперматогенном эпителии обнаруживаются сустентоциты, тонкая структура которых в общих чертах соответствует группе контроля. В то же время появляются клетки, в цитоплазме которых развиваются адаптивные реакции, на которых следует остановиться более подробно.

После 1-й недели адаптации к низким температурам появляются сустентоциты, в цитоплазме которых наблюдается гиперплазия элементов гладкой эндоплазматической сети, морфологическим эквивалентом которой являются многочисленные мелкие везикулы округлой формы, локализующиеся преимущественно в апикальных отделах клеток. После 2 недель адаптации вакуолизация адлюминальных фрагментов цитоплазмы сустентоцитов усиливается, однако манифестации она достигает после 4 недель адаптации, когда в цитоплазме клеток повсеместно можно наблюдать расширенные ве-

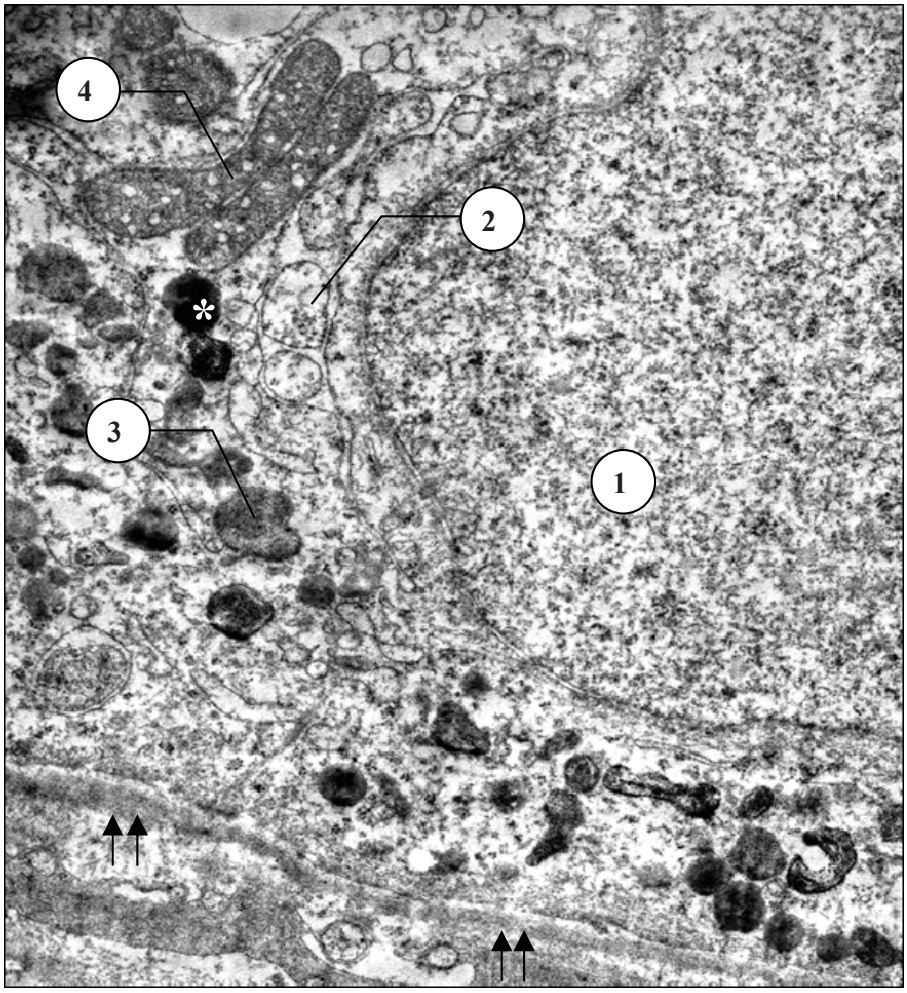

Рис. 1. Яичко интактной крысы. Фрагмент ядра (1) и цитоплазмы сустентоцита; 2 – вакуолярные элементы гладкой ЭПС; 3 – лизосомы; 4 – митохондрии; * – липидные включения; ↑↑ – базальная мембрана. Окрашивание уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение 23 000

зикулы агранулярной эндоплазматической сети (рис. 3, 4, Б).

Уже на ранних сроках адаптации в апикальных фрагментах сустентоцитов обнаруживаются головки созревающих сперматид с нарушением структур тубуло-бульбарного комплекса и признаками дегенерации. В цитоплазме сустентоцитов обнаруживаются достаточно крупные фагосомы, содержащие фрагменты погибших клеток (см. рис. 3, А, Б). После 2 недель адаптации число дегенерирующих сперматид в апикальных частях цитоплазмы сустентоцитов увеличивается, в цитоплазме сустентоцитов в большом количестве обнаруживаются фаголизосомы, содержащие фрагменты зародышевых клеток. После 4 недель адаптации созревающих сперматид с признаками дегенерации в цитоплазме сустентоцитов становится меньше.

Межклеточные контакты между круглыми сперматидами и клетками Сертоли на всех этапах адаптации не нарушены (см. рис. 3, А), но уже после 1-й недели адаптации в цитоплазме сперматоцитов, круглых и созревающих сперматид появляется деформация внутренних мембран и вакуолизация митохондрий, которая сохраняется на всех этапах адаптации (см. рис. 4, А). Специализированные контакты Сертоли-Сертоли с зонами эктоплазматической специализации сохраняют свою структурную целостность на всех сроках адаптации.

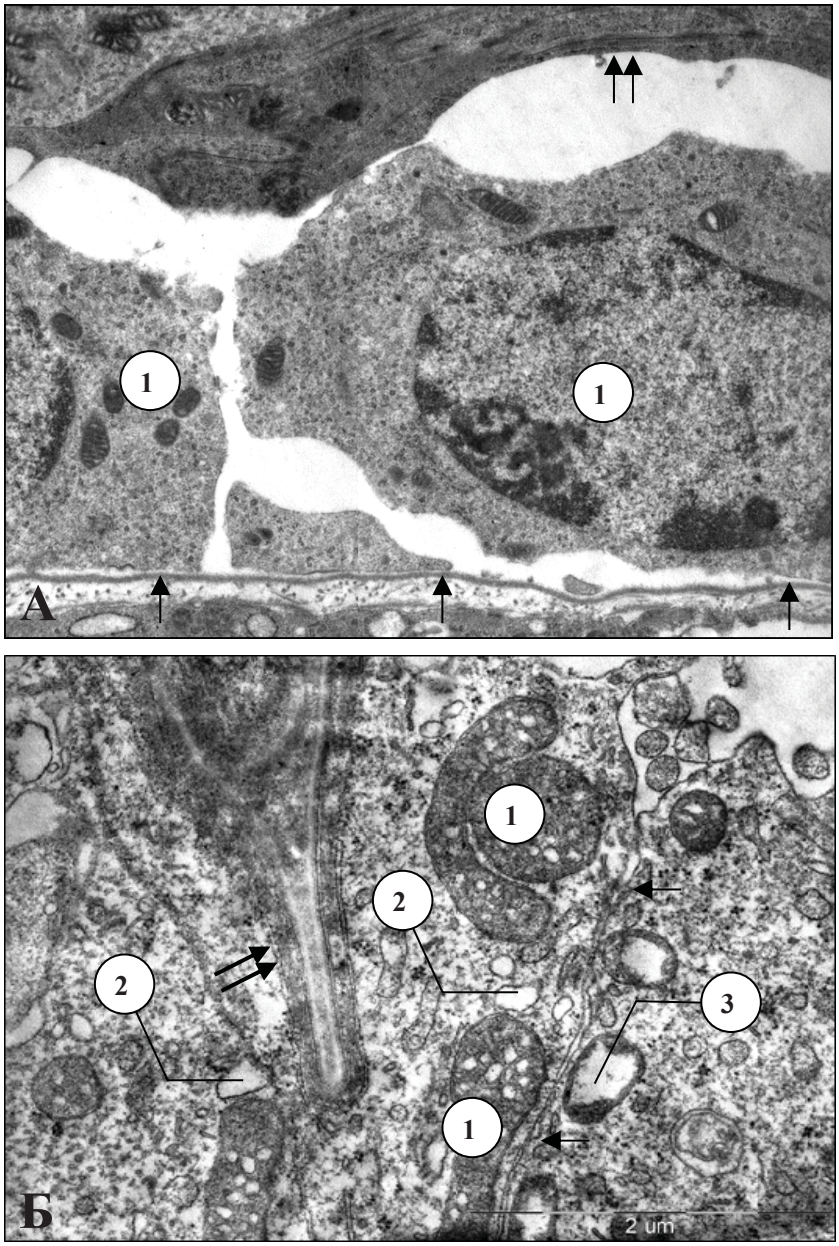

Рис. 2. Яичко интактной крысы. Окрашивание уранилацетатом и цитратом свинца. А – базальный компартмент. 1 – сперматогонии типа Б; ↑ – базальная мембрана; ↑↑ – контакт Сертоли-Сертоли с зонами эктоплазматической специализации. Увеличение 22 000. Б – апикальный фрагмент сустентоцита. 1 – митохондрии; 2 – везикулы агранулярной ЭПС; 3 – митохондрия круглой сперматиды; ↑ – контакт сустентоцита и круглой сперматиды, ↑↑ – головка созревающей сперматиды и тубулобульбарный комплекс. Увеличение 28 000

После 2-й недели адаптации в цитоплазме сустентоцитов уменьшается количество митохондрий, электронная плотность митохондриального матрикса снижается (см. рис. 4, Б). Существенное уменьшение числа митохондрий после 4 недель адаптации затрудняет идентификацию боковых отростков сустентоцитов, расположенных между сперматогенными клетками, электронная плотность клеточного матрикса снижается.

В цитоплазме вакуолизированных сустентоцитов встречаются ультраструктурные признаки деградации мембранных структур цитоплазмы в виде концентрических электронно-плотных образований. На поздних сроках адаптации присутствуют уже сформированные миелиноподобные структуры, которые находятся либо внутри вакуолей, либо самостоятельно располагаются в цитозоле клеток. Количество липидных капель в базальной цитоплазме сустентоцитов увеличено на всех сроках адаптации.

После 4 недель адаптации в яичках крыс отмечается угнетение экспрессии индуцибельной NO-синтетазы: продукты реакции на NO-синтетазу в сперматогенных клетках и сустентоцитах отсутствуют, структуры сперматогенного эпителия имеют базофильную окраску, обусловленную гематоксилином. Оптическая плотность продуктов реакции 0,196±0,006 усл. ед., что на 35 % ниже, чем у крыс контрольной группы.

Несмотря на сформировавшееся мнение об устойчивости клеток Сертоли к действию неблагоприятных факторов среды, ультраструктурный анализ показал, что при адапта-

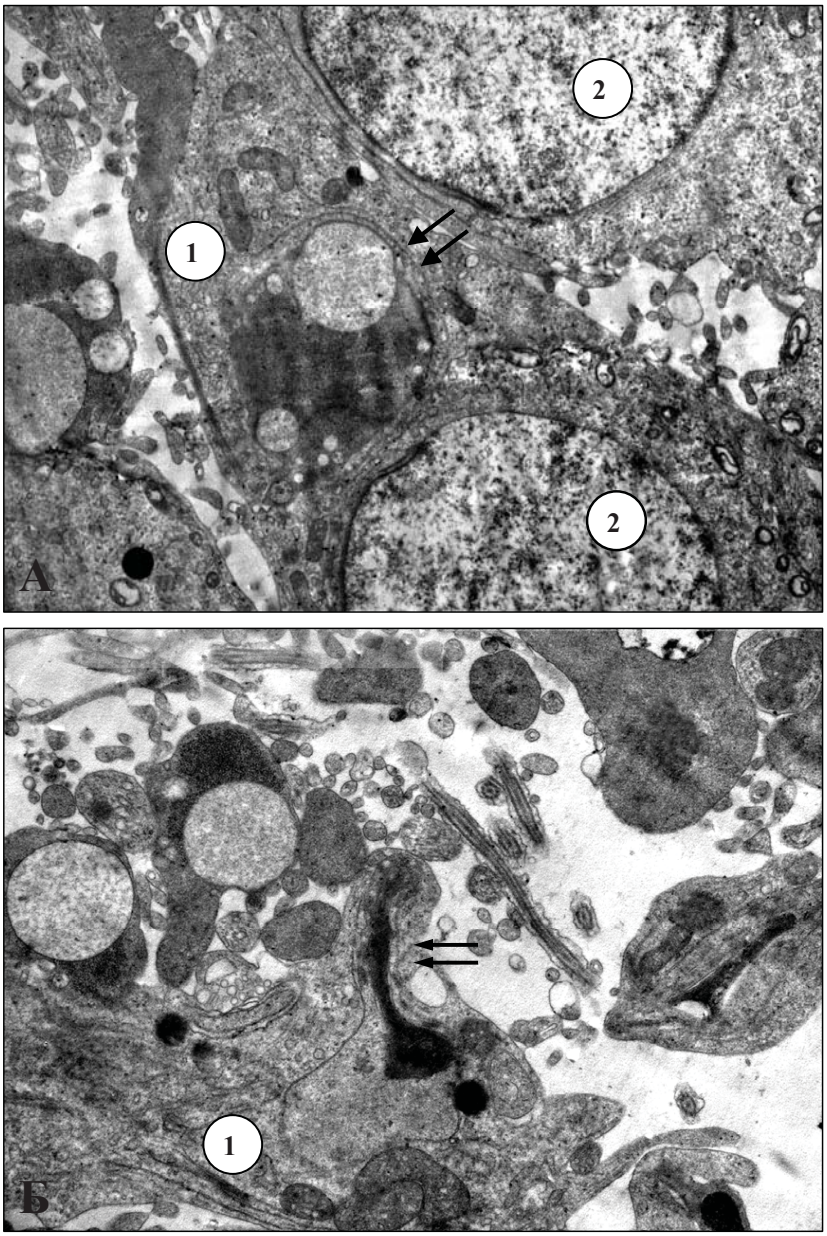

Рис. 3. Яичко после 1-й недели адаптации. Окрашивание уранилацетатом и цитратом свинца. А – фагосома (↑↑) в цитоплазме сустентоцита (1); 2 – ядра сперматид. Увеличение 18 000. Б – головка созревающей сперматиды с признаками дегенерации (↑↑) в апикальной цитоплазме сустентоцита (1). Увеличение 22 000

ции животных к низким температурам в сустентоцитах происходят адаптивные перестройки внутриклеточных структур.

Обнаруженная вакуолизация цитоплазмы клеток Сертоли, ультраструктурной основой которой является дилатация элементов эндоплазматической сети, уменьшение количества митохондрий, появление миелиноподобных структур в цитоплазме – наиболее распространенные реактивные изменения сустентоцитов [4, 10, 11]. Данные изменения не являются специфичными для действия какого-либо конкретного фактора, были описаны в сустентоцитах крыс при пренатальном введении антиандрогенов, действии субтоксических доз фунгицидов, введении антигельминтных препаратов, после хирургической коррекции экспериментального крипторхизма [4, 6, 9, 11].

Гиперплазия и дилатация элементов гладкого эндоплазматического ретикулума в цитоплазме сустентоцитов, по-видимому, являются компенсаторно-приспособительной реакцией клеток, направленной на восстановление их секреторной активности, а увеличение содержания в базальных отделах цитоплазмы липидных включений может быть связано либо с усилением стероидогенеза клетками Сертоли, либо, напротив, может свидетельствовать о замедленной утилизации липидов.

Одним из феноменов, свидетельствующих о нарушении секреторной функции сустентоцитов, является вакуолизация митохондрий в цитоплазме сперматоцитов и сперматид. В условиях нормально протекающего сперматогенеза изменение морфологии митохондрий является одним из маркеров цитологической модификации клеток, вступающих в мейоз [3], сущность которой заключается в смещении крист на периферию органелл, к наружной митохондриальной мембране. Морфологическую модификацию митохондрий в герминативных клетках вызывает активин А, секретируемый сустентоцитами [3, 12]. Во всех клетках мейотической и постмейотической популяций при адаптации к холоду в митохондриях наблюдаются вакуоли, сформированные из деформированных внутренних мембран, но радикального смещения крист на периферию не происходит. Таким образом, вакуолизация митохондрий указывает на нарушения паракринной регуляции сперматогенеза клетками Сертоли.

Мы сообщали об уменьшении диаметра извитых семенных канальцев и истощении генерации созревающих сперматид при адаптации к холоду [1]. Уменьшение диаметра извитых канальцев обычно обусловлено двумя факторами: редукцией количества герминативных клеток в сперматогенном эпителии и уменьшением секреции жидкой среды канальца клетками Сертоли [4, 10]. Следовательно, в условиях адаптации нарушается способность сустентоцитов к выработке и секреции внутриканальцевой жидкости, которая необходима для выживаемости созревающих сперматид [4, 10].

Отсутствие в сперматогенном эпителии продуктов реакции на NO-синтетазу, обнаруженное

после 4 недель адаптации, указывает на дефицит оксида азота. Дефицит оксида азота мог стать причиной нарушения специализированных контактов между сустентоцитами и сперматидами и мог привести к истощению популяции круглых и созревающих сперматид, зарегистрированной качественно и количественно на всех этапах адаптации к низким температурам [1].

Согласно литературным данным, в яичках крыс обнаруживаются все три традиционные изоформы NO-синтетазы: нейрональная, индуцибельная и эндотелиальная [3, 7], а также специфичная для семенников форма этого фермента, названная тестикулярная NO-синтетаза [8]. Оксид азота, синтез которого обеспечивает фермент NO-синтетаза, принимает активное участие в регуляции сперматогенеза, обеспечивая гомеостаз специфического микроокружения в извитых семенных канальцах яичек крыс [3, 7, 8]. Кроме того, оксид азота регулирует поддержание целостности специализированных межклеточных контактов, таких как зоны эктоплазматической специализации по ходу контактов Сертоли-Сертоли, а также контакты между сустентоцитами и сперматидами [3, 8].

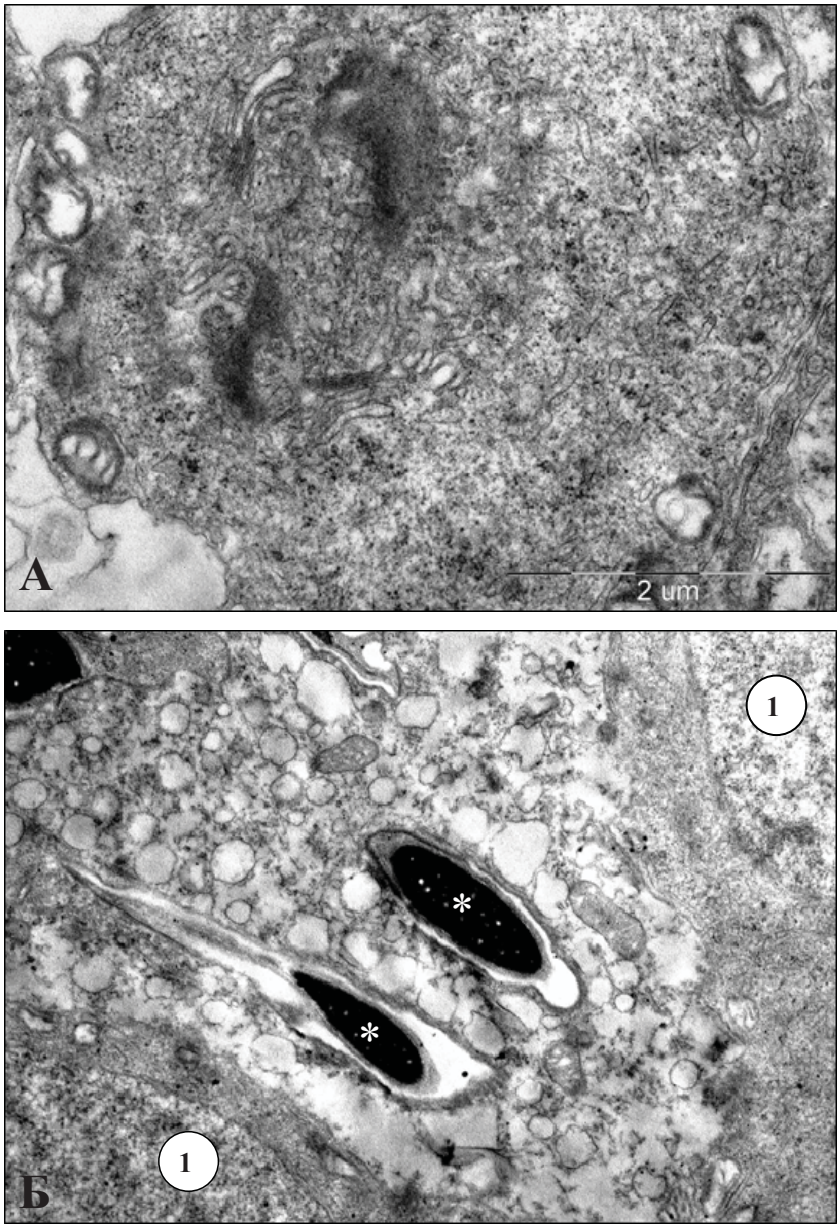

Рис. 4. Яичко после 4-й недели адаптации. Окрашивание уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение 25 000. А – вакуолизация митохондрий в цитоплазме круглой сперматиды. Б – гиперплазия и дилатация элементов гладкой ЭПС сустентоцита. 1 – ядра круглых сперматид; * – ядра созревающих сперматид. Увеличение 18 000

Отсутствие в сперматогенном эпителии продуктов реакции на NO-синтетазу, обнаруженное после 4 недель адаптации, может быть следствием развития у крыс общего адаптационного синдрома. Супрессия NO-синтетазы была описана при эмоциональном стрессе у крыс, что объясняется избытком глюкокортикоидов, сопровождающим развитие стресс-реакции [2].

Таким образом, на этапах адаптации животных к низким температурам в популяции сустентоцитов появляются клетки с ультраструктурными признаками функционального напряжения, направленными на поддержание секреторной функции. Обнаруженные нарушения функциональной активности сустентоцитов могут быть причиной нарушений сперматогенеза, сопровождающихся потерей герминативных клеток.

Заключение. В условиях адаптации к низким температурам в цитоплазме сустентоцитов наблюдаются гиперплазия и дилатация элементов гладкой эндоплазматической сети, которые появляются после 1-й недели и достигают манифестации к 4-й неделе адаптации.

На всех этапах адаптации обнаруживаются ультраструктурные и иммуноцитохимические изменения, косвенно указывающие на угнетение секреторной активности сустентоцитов: накопление липидных включений в цитоплазме сустентоцитов, снижение экспрессии NO-синтетазы, вакуолизацию митохондриального компартмента в сперматогенных клетках адлюминального пространства.

После 4 недель адаптации в некоторых сустентоцитах наблюдаются ультраструктурные признаки функционального напряжения и истощения в виде вакуолизации цитоплазмы, просветления клеточного матрикса, накопления миелиноподобных структур, уменьшения количества митохондрий.

Структурное обеспечение сперматогенеза сустентоцитами при адаптации к низким температурам не нарушается, о чем свидетельствуют целостность специализированных контактов Сертоли-Сертоли и зон эктоплазматической специализации, а также контактов между сустентоцитами и сперматидами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Саяпина И.Ю., Огородникова Т.Л.* Количественная оценка функциональной активности семенников крыс на этапах адаптации к низким температурам // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – 2013. – № 05(89). – IDA [article ID]: 0891304023. – Режим доступа: http://ej.kubagro.ru/2013/05/pdf/23.pdf.

2. *Судаков К.В.* Эволюция концепции стресса // Вестник Российской АМН. – 2008. – № 11. – С. 59–65.

3. *Cheng C.Y.* Molecular mechanisms of spermatogenesis // Springer science + Bisness Media, LLC Landes Bioscience. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2008. Austin, Texas, USA, Vol. 638, 271 p.

4. *Creasy D.M., Chapin R.E.* Testicular and epididymal toxicity: Pathogenesis and potential mechanisms of toxicity //Spermatogenesis, 2014. – Vol. 4, № 2. – IDA [article ID]: e1005511. – To link to this article: https://doi.org/10.1080/21565562.2014.1005511.

5. *Hazra R., Corcoran L., Robson M. et al.* Temporal Role of Sertoli Cell Androgen Receptor Expression in Spermatogenic Development // Molecular Endocrinology, 2013, Vol. 27, No. 1, P. 12–24.

6. *Johnson K.J.* Testicular histopathology associated with disruption of the Sertoli cell cytoskeleton // Spermatogenesis, 2014, Vol. 4, No. 2. – IDA [article ID]: e979106. – To link to this article: https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979106.

7. *Kolasa A., Marchlewicz M., Kurzava R.* The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the testis and epididymis of rats with a dihydrotestosterone (DHT) deficiency// Cellular & Molecular Biology Letters, 2009, Vol. 14, P. 511–527.

8. *Lee N.P., Cheng C.Y.* Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis // Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2008, Vol. 1, No. 1, P. 25–32.

9. *Murphy C.J., Richburg J.H.* Implications of Sertoli cell induced germ cell apoptosis to testicular pathology// Spermatogenesis, 2014. – Vol. 4, No. 2. – IDA [article ID]: e979110. To link to this article: https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979110.

10. *Odum J., Creasy D., Cartwright J. et al.* Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents // ENV/JM/MONO, 2009,Vol. 11, No. 106.

11. *Vidal J.D., Whitney K.M.* Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity Spermatogenesis, 2014, Vol. 4, No. 2. – IDA [article ID]: e979099. To link to this article: https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979099.

12. *Walker W.H.* Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis // Spermatogenesis, 2011, Vol. 1, No. 2, P. 116–120.

Саяпина Ирина Юрьевна, *д-р биол. наук, проф. кафедры «Гистология и биология», ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. Россия.*

675006, г. Благовещенск, ул. Горького, 95.

Тел.: (4162) 31-90-14.

Труш Наталья Владимировна, *д-р биол. наук, проф. кафедры «Биология и охотоведение», Дальневосточный государственный аграрный университет. Россия.*

Мандро Николай Михайлович, *д-р вет. наук, проф. кафедры «Ветеринарно-санитарная экспертиза, эпизоотология и микробиология», Дальневосточный государственный аграрный университет. Россия.*

675000, г. Благовещенск, ул. Ленина, 180.

Тел.: (4216) 99-03-35.

Чубин Алексей Николаевич, *д-р вет. наук, руководитель, Ветеринарный центр. Россия.*

354057, г. Сочи, ул. Туапсинская, 5/1.

Тел.: (862) 261-00-88.

Ключевые слова: *сустентоциты; клетки Сертоли; крысы; адаптация; низкие температуры; ультраструктурный анализ; трансмиссионная электронная микроскопия.*

SERTOLI'S CELLS OF RATS IN DYNAMICS OF ADAPTATION TO LOW TEMPERATURES ACCORDING TO THE DATA OF THE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS

Sayapina Irina Yurevna, *Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair "Histology and Biology" Amur State Medical Academy. Russia.*

Trush Natalya Vladimirovna, *Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair "Biology and Game Management", Far East State Agricultural University. Russia.*

Mandro Nikolay Mikhaylovich, *Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the chair "Veterinary and Sanitary Examination, Epizootology and Microbiology", Far East State Agricultural University. Russia.*

Chubin Alexey Nikolaevich, *Doctor of Veterinary Sciences, Head, Veterinary Center. Russia.*

Keywords: *Sertoli's cells; rats; adaptation; low temperatures; ultrastructural analysis; transmission electronic microscopy.*

The results of the ultrastructural analysis of rats' Sertoli's cells at the stages of animal adaptation to low temperatures are presented. It was established by the method of transmission electron microscopy that cells with ultrastructural signs of functional tension appear in the population of Sertoli's cells and their purpose is to maintain the secretory function. In Sertoli's cells, hyperplasia and dilatation of elements of the smooth endoplasmic reticulum are observed. They are marked after the 1st week and onset by the 4th week of adaptation. After 4 weeks of adaptation, some ultrastructural signs of depletion are observed in the form of vacuolization of the cytoplasm, enlightenment of the cell matrix, accumulation of myelin-like structures, reduction in the number of mitochondria. The observed ultrastructural changes in the functional activity of Sertoli's cells may be the cause of spermatogenesis disorders accompanied by loss of germinativecells.