

УДК 57.053+612.818.91

ВЛИЯНИЕ ДЕНЕРВАЦИИ СЕМЕННИКА НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТОВ-ИНДУКТОРОВ АПОПТОЗА В СПЕРМАТОГЕННЫХ КЛЕТКАХ

Слесарева Е.В., Слесарев С.М., Арав В.И., Ляпейкова О.В., Гречнев А.Е.
ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки
РФ, Ульяновск, e-mail: gistology2@mail.ru

Проведен анализ суточного ритма экспрессии ферментов, участвующих в активации процесса апоптоза в сперматогенных клетках (PARP, прокаспазы-3) у интактных самцов белых крыс и животных после правосторонней денервации семенника. Интактные и опытные животные содержались при фиксированном режиме освещения (свет с 6 до 18 ч). Денервации подвергался правый семенник у животных опытной группы. Активность ферментов определялась спустя 30 суток после операции денервации в темновую (1 ч) и световую (13 ч) фазы свето-темнового цикла в течение двух суток. Ферменты выявлялись иммуногистохимически на парафиновых срезах. Денервация привела к угнетению сперматогенной активности в некоторых извитых семенных канальцах. Циркадианный ритм экспрессии изученных ферментов, выявленный у интактных животных, сохранялся и после денервации семенника в канальцах с сохраненным сперматогенезом. Однако после односторонней денервации выявляется значительный рост активности PARP и прокаспазы 3 в сперматогенных клетках денервированного семенника по сравнению с интактными животными.

Ключевые слова: апоптоз, сперматогенез, циркадианный ритм, прокаспазы-3, PARP

THE IMPACT OF TESTES DENERVATION ON ENZYME OF APOPTOSIS INDUCERS EXPRESSION IN THE SPERMATOGONIA CELLS

Slesareva E.V., Slesarev S.M., Arav V.I., Lyapeykova O.V., Grechnev A.E.
FGBOU VPO «Ulyanovsk State University» of the Ministry of Education and Science of Russia,
Ulyanovsk, e-mail: gistology2@mail.ru

The analysis of the daily rhythm of expression of enzymes involved in the activation of apoptosis in spermatogenic cells (PARP, procaspase-3) in intact male white rats and animals after denervation of right testis was performed. The intact and experimental animals were kept at a fixed mode of illumination (light from 6 to 18 h). The right testis was subjected to denervation in experimental group of animals. The enzyme activity was determined after 30 days after denervation surgery in the dark (1 h) and light (13 h) phase light-dark cycle for two days. The enzymes were detected by immunohistochemistry on paraffin sections. The denervation led to the oppression of spermatogenic activity in some convoluted seminiferous tubules. The circadian rhythm of expression of these enzymes, which was detected in intact animals, persisted after denervation in the tubules of the testis with preserved spermatogenesis. However, after unilateral denervation a significant increase in the activity of PARP and procaspase 3 was revealed in the spermatogenic cells of the testis after denervation compared with testis of intact animals.

Keywords: apoptosis, spermatogenesis, circadian rhythm, procaspase-3, PARP

Процесс созревания мужских половых клеток сопровождается постоянной физиологическая дегенерация части сперматогенных клеток. С введением в науку в 1972 г. J.F.R. Керг термина «апоптоз», физиологическую дегенерацию созревающих половых клеток стали рассматривать как проявление генетически регулируемого процесса – апоптоза. Апоптоз сперматогенных клеток был выявлен на всех этапах сперматогенеза – при размножении сперматогоний, на стадии пахитены, мейоза, созревания сперматид [5]. Инициация апоптоза в семенных канальцах может возникать по нескольким причинам: нарушения в структуре ДНК, происходящие в ходе митоза сперматогоний и последующего мейоза сперматоцитов, отсутствие контакта образующихся сперматогенных клеток с клетками Сертоли, воздействия каких-либо внешних факторов. То есть такой процесс, как апоптоз, сопровождающийся синтезом белков de novo, под-

чиняется органным и тканевым регуляторным механизмам. В предыдущей работе мы показали зависимость процесса апоптоза сперматогенных клеток от влияния биологически активных веществ эпифиза [3]. Однако сперматогенез регулируется не только гуморальными факторами, но и имеет контроль со стороны нервной системы. **Целью данной работы** явилось изучение влияния денервации на ритмичность процесса апоптоза в созревающих половых клетках.

Материалы и методы исследования

Опыт выполнен на 48 самцах беспородных белых крыс массой 160–200 г. Животные в течение 20 дней адаптировались к 12 часовому режиму освещенности (освещение с 6 до 18 ч). На всем протяжении опыта доступ к пище и воде был свободным. Для изучения хроноструктуры активности ферментов индукторов апоптоза в сперматогенных клетках и влияния денервации на данный процесс по истечении адаптационного периода крысы были разделены на две экспериментальные группы: интактные контрольные ($n = 24$)

и животные после денервации правого семенника ($n = 24$). Денервация проводилась по методике, предложенной В.В. Невструевой, путем удаления адвентиции с кольцевого участка семявыносящего протока совместно с поверхностным и глубоким семенниковыми нервами [2]. Все эксперименты, уход и содержание животных осуществлялось в соответствии с Директивой № 63 от 22.09.10 г. Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Выживаемость животных после операции составила 100%. Оперированных животных продолжали содержать при режиме освещенность/темнота, равном 12/12 (освещение с 6 до 18 ч).

Выведение животных из эксперимента производили под эфирным наркозом на 30–31-й день после денервации в 1 ч (темное время) и 13 ч (светлое время) в течение двух суток, что обеспечивало исследование активности ферментов на протяжении двух периодов циркадианного ритма. В каждую временную точку эксперимента входило по 6 животных контрольной и опытной групп. Семенники фиксировали в забуференном формалине и по стандартной гистологической методике изготавливали парафиновые поперечные срезы толщиной 5 мкм. Об уровне апоптоза созревающих сперматогенных клеток судили по активности ферментов, участвующих в индукции апоптоза (прокаспазы 3) и в посттрансляционной репарации ДНК (PARP-1). Белки-ферменты выявлялись иммуногистохимически (первичные моноклональные антитела компании «Eritomics inc», система визуализации DAB-хромоген). Оценку активности ферментов проводили в сперматоцитах на стадии метафазы мейоза и сперматиды 7–8 этапа развития, используя показатель оптической плотности окрашивания ядер (программа денситофотометрии Мекос-С1).

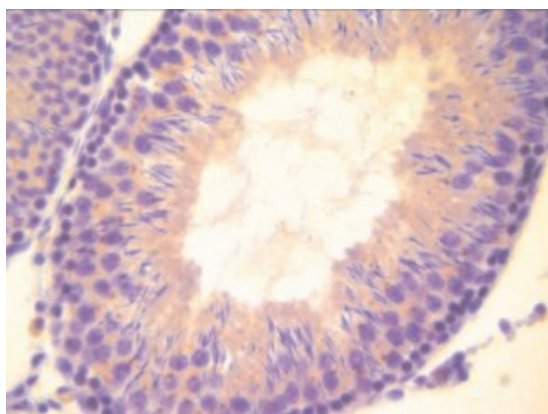
Для микроскопирования применяли микроскоп Axiostar Plus (Carl Zeiss) при увеличении $\times 1000$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 100$). Измерения производились с помощью медицинской компьютерной видеосистемы, состоящей из микроскопа Axiostar Plus (Carl Zeiss), цифровой фотокамеры Nikon COOLPIX 995, персонального компьютера Pentium-IV и программы

автоматизированной обработки изображений Мекос С-1. Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода Фишера–Стьюдента. Уровень значимости был принят $P < 0,05$.

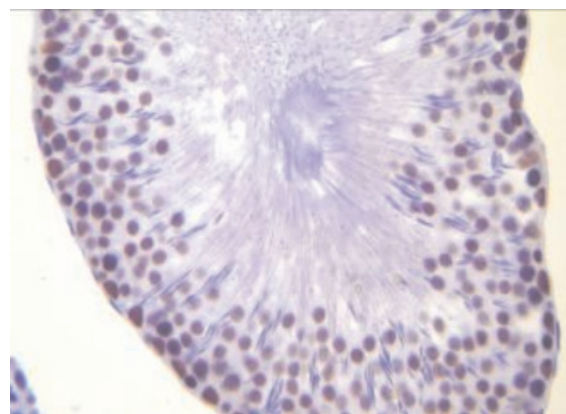
Результаты исследования и их обсуждение

Экспрессия белков, участвующих в инициации апоптоза PARP-1 (p116/25) и прокаспазы-3, у интактных белых крыс выявлялась на всех стадиях развития сперматогенных клеток – от сперматогоний промежуточного типа и типа Б до сперматид 10–11 этапов развития. С целью оценки суточного ритма активности синтеза изучаемых белков были выбраны два из ключевых этапов развития сперматогенных клеток – мейотическое деление сперматоцитов и этап спермиации (изучались сперматиды 7–8 этапов развития). На данных этапах был выявлен циркадианный ритм уровня экспрессии изучаемых белков в созревающих половых клетках. Содержание прокаспазы-3 и PARP-1 (p116/25) изменялось в течение суток синхронно, повышаясь в темновую фазу исследуемого периода и снижаясь в световую, что коррелировало с пролиферативной активностью сперматогоний и сперматоцитов [1].

Изучая уровень активности ферментов – индукторов апоптоза в денервированных семенниках (прокаспазы 3, PARP-1), нами выявлено значительное увеличение уровня их экспрессии в данной экспериментальной группе при общем сохранении циркадианного ритма экспрессии изучаемых ферментов (табл. 1). Рост экспрессии прокаспазы 3 и PARP-1 после денервации семенника по сравнению с интактными животными более чем в 1,8–2 раза.



а



б

Рис. 1. Извитые семенные каналцы семенников интактных животных. Иммуногистохимическое окрашивание на прокаспазу 3 – а и PARP-1 (p116/25) – б, доокрашивание гематоксилином. Увеличение $\times 400$

Оптическая плотность комплексов PARP-1-АТ и прокаспазы 3-АТ в сперматогенных клетках ($M \pm m$), опт. ед.

	Этап развития половых клеток	Интактные животные			Животные после денервации семенника		
		Светлое время	Темное время	Мезор	Светлое время	Темное время	Мезор
PARP-1	Ядра сперматид 7-8 этапов развития	0,399 ± 0,025	0,567 ± 0,018	0,491 ± 0,040	0,732 ± 0,056	0,886 ± 0,041	0,811 ± 0,052
	Цитоплазма сперматоцитов на этапе мейоза	0,172 ± 0,036	0,398 ± 0,029	0,293 ± 0,054	0,456 ± 0,038	0,553 ± 0,034	0,498 ± 0,038
Прокаспазы 3	Ядра сперматид 7-8 этапов развития	0,257 ± 0,031	0,417 ± 0,037	0,341 ± 0,041	0,521 ± 0,05	0,673 ± 0,057	0,592 ± 0,053
	Цитоплазма сперматоцитов на этапе мейоза	0,103 ± 0,022	0,290 ± 0,026	0,195 ± 0,032	0,304 ± 0,056	0,412 ± 0,061	0,362 ± 0,072

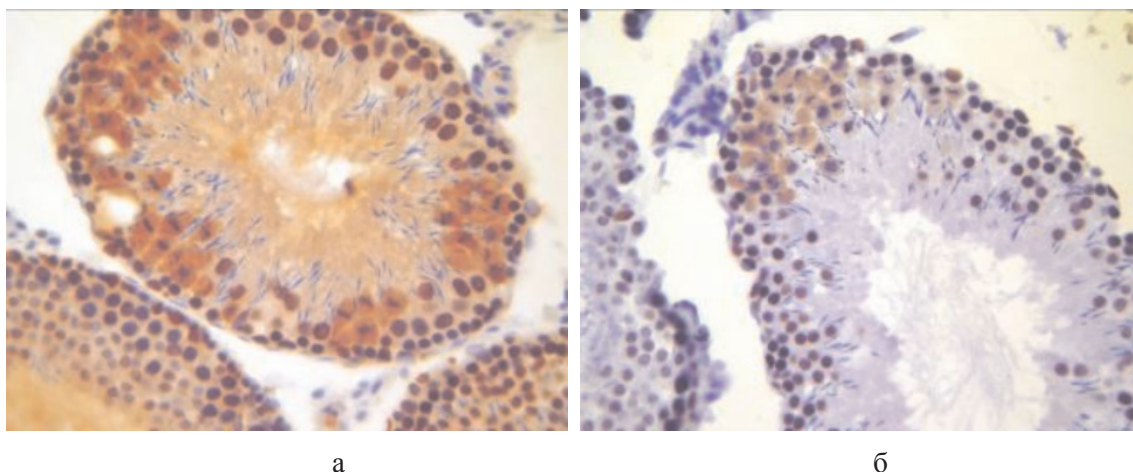


Рис. 2. Извитые семенные каналы животных после денервации семенника. Иммуногистохимическое окрашивание на PARP-1 (p116/25) – а и прокаспазу 3 – б, доокрашивание гематоксилином. Увеличение x400

Сохранялись различия между дневным и ночным уровнем синтеза как PARP-1 (p116/25), так и прокаспазы 3, то есть при денервации циркадианный ритм продукции данных белков сохранялся. Известно, что после денервации наиболее активно процессы апоптоза наблюдаются в созревающих сперматидях, значительно меньше затрагиваются сперматогонии и сперматоциты [6, 4]. Таким образом, после денервации наблюдается рост повреждений ДНК, с чем связано и увеличение активности PARP-1 в сперматоцитах и сперматидях, а также активация каспазозависимого пути апоптоза. Наличие циркадианного ритма пролиферации сперматогоний в денервированных семенниках позволяет сохранить и суточный ритм экспрессии ферментов-индукторов апоптоза.

Известно, что денервация приводит к изменению кровоснабжения органа. В семеннике это влечет за собой нарушение гематотестикулярного барьера, которое проявляется в изменении клеток Сертоли и утраты ими связи со сперматогенными клетками [2]. Нарушение связей сперматогенных клеток с клетками Сертоли, по видимому, приводит к росту структурных нарушений в ДНК созревающих половых клеток, что вызывает рост активности ферментов, репарирующих данные повреждения (PARP-1), и ферментов, активирующих процесс апоптоза (каспазы-3). Однако нарушения в структуре извитых канальцев развиваются в течение длительного периода времени и зависят от исходных условий кровоснабжения. В то же время наличие системы эндокринных механизмов регуляции

суточных ритмов, в частности, биологически активных веществ эпифиза, позволяет сохранить их даже в органе с нарушенной иннервацией.

Таким образом, полученные результаты показали, что периферическая денервация не полностью нарушает течение сперматогенеза. Не оказывая влияние на наличие суточного ритма процесса апоптоза, денервация, тонко нарушая проницаемость стенки извитых семенных канальцев и функции клеток Сертоли, приводит к значительному росту активности ферментов, участвующих в процессах репарации ДНК и апоптозе.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России.

Список литературы

1. Арав В.И., Сыч В.Ф., Слесарева Е.В. Влияние эпифизэктомии на суточную ритмичность сперматогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 136, №12. – С. 683–685.
2. Невструева, В.В. Структурная организация гематотестикулярного барьера в нормальных физиологических условиях и при нейродистрофическом процессе в семеннике / В.В. Невструева, Т.В. Боронихина, Л.А. Суворова // Тр.2-го Моск. мед. ин-та. – М., Т.СХХVI, сер. морфология, 1979. – Вып. 2. – С. 85–90.
3. Циркадианный ритм апоптоза сперматогенных клеток интактных белых крыс и его нарушения после эпифизэктомии / Е.В. Слесарева, С.М. Слесарев, В.И. Арав, О.В. Ляпейкова, А.В. Гальчин // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1; URL: www.science-education.ru/107-8251.
4. Apoptosis in male germ cells induced by testicular denervation / Y.G. Gong, Y.R. Yang, W. Zhang, M. Gu, C.J. Yin // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2006. – Vol. 12, №11. – P. 968–973.
5. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the Common Marmoset reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency / G.F. Weinbauer, H. Aslam, H. Krishnamurthy, M.N. Brinkworth, A. Einspanier, J.K. Hodges // Biol. Reprod.– 2001.– Vol. 64.– P. 120–126.
6. Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis / S. Huo,

Z. Xu, X. Zhang, J. Zhang, S. Cui // J Reprod Dev. – 2010. – Vol. 56(4). – P. 370–378.

References

1. Arav V.I., Sych V.F., Slesareva E.V. Vlijanie epifisektomii na sutochnuju ritmichnost spermatogeneza // Bjulleten eksperimental. biologii i mediciny, 2003, Vol. 136, no.12, pp. 683–685.
2. Nevstrueva V.V. Strukturnaja organizacija gematotestikuljarnogo barera v normalnyh fiziologicheskikh uslovijah i pri nejrodistroficheskom processe v semennike / V.V. Nevstrueva, T.V. Boronichina, L.A. Suvorova // Tr. 2-go Mosk. Med. in-ta. M., Vol. CXXVI, no. 2. 1979. pp. 85–90.
3. Slesareva E.V., Slesarev S.M., Arav V.I., Lapejkova O.V., Galchin A.V. Cirkadiannyj ritm apoptosa spermatogennyh kletok intaktnyh belyh krys i ego narusheniya posle epifisektomii// Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2013. no. 1; URL: www.science-education.ru/107-8251.
4. Apoptosis in male germ cells induced by testicular denervation / Gong Y.G., Yang Y.R., Zhang W., Gu M., Yin C.J. // Zhonghua Nan Ke Xue. 2006. Vol.12, no. 11. pp. 968–973.
5. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the Common Marmoset reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency / G.F. Weinbauer, H. Aslam, H. Krishnamurthy, M.N. Brinkworth, A. Einspanier, J.K. Hodges // Biol. Reprod.– 2001. Vol. 64. pp. 120–126.
6. Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis / Huo S., Xu Z., Zhang X., Zhang J., Cui S. // J. Reprod Dev. 2010. Vol. 56(4). pp. 370–378.

Рецензенты:

Генинг Т.П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии медицинского факультета Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск;

Напалкова С.М., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии факультета последипломного, медицинского и фармацевтического образования Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 08.04.2013.