УДК 591.16:616-089.22

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО АППАРАТА САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

Логинов П.В., Николаев А.А.

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru

Ограничение двигательной активности представляет собой мощнейший стрессирующий фактор, вызывающий эмоциональную реакцию у животных. Целью настоящей работы было изучение эффектов воздействия иммобилизационного стресса на функциональное состояние разных звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси самцов белых крыс. Животных массой 200–220 г подвергали иммобилизации путем помещения их в специальные пластиковые клетки-пеналы на 4 часа ежедневно в течение 30 дней. Усиление перекисного гемолиза эритроцитов в экспериментальных условиях свидетельствует о развитии окислительного стресса. В условиях иммобилизации имеет место усиление процессов перекисного окисления липидов в ткани семенников и гипоталамической ткани. Относительные массы гонад и гипофиза были снижены к концу экспериментальных воздействий. Уровни тестостерона и лютеинизирующего гормона снижались в результате иммобилизации в соответствии с коэффициентом положительной корреляции r = + 0,601. Количество дефективных форм эпидидимальных сперматозоидов возросло более чем в 3,5 раза, по сравнению с контролем. Ведущими нарушениями были облом и потеря хвоста сперматозоидов. Таким образом, иммобилизационный стресс вызывает функциональные нарушения на всех уровнях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, гипоталамус, семенники, эпидидимальные сперматозоиды, тестостерон, лютеинизирующий гормон

FUNCTIONAL STATE OF REPRODUCTIVE SYSTEM IN WHITE MALE RATS UNDER CONDITIONS OF IMMOBILIZATION STRESS

Loginov P.V., Nikolaev A.A.

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan, e-mail: agma@astranet.ru

The restriction of physical activity is a very powerful stressing factor that causes an emotional response in animals. The purpose of this work was to study the effects of immobilization stress on functional state of different units of hypothalamic-pituitary-gonadal axis in white male rats. The animals weighing 200–220 g were subjected to immobilization by placing them into special plastic boxes for 4 hours daily during 30 days. The increase of erythrocyte peroxide haemolysis under experimental conditions testifies to oxidative stress development. Under conditions of immobilization, lipid peroxidation acceleration in testicular and hypothalamic tissues has been found to take place. The relative weights of gonads and pituitary were decreased to the end of experimental influence. Testosterone and luteinizing hormone levels decreased as a result of immobilization in accordance with the positive correlation coefficient r = + 0,601. The total number of defective epididymal spermatozoa decreased by more than 3,5 times compared to the control. The leading disorders were broken and lost tails of spermatozoa. Thus, immobilization stress causes functional disorders in all units of hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Keywords: lipid peroxidation, malonic dialdehyde, hypothalamus, testes, epididymal spermatozoa, testosterone, luteinizing hormone

Одним из компонентов здорового образа жизни является постоянная двигательная активность. Движение – неотъемлемая составляющая живой материи. Гиподинамия является одним из наиболее существенных факторов, способствующих развитию тех или иных патологических состояний. В условиях недостатка движения нарушается деятельность целого ряда систем организма: иммунной, нервной, эндокринной и, конечно же, сердечно-сосудистой [11]. Ограничение двигательной активности представляет собой мощнейший стрессирующий фактор, вызывающий эмоциональную реакцию у животных [9, 11]. Вместе с тем, о влиянии иммобилизационного стресса на функциональное состояние репродуктивной системы сказано мало.

Цель исследования – изучить эффекты воздействия иммобилизационного стресса на функциональное состояние разных звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси самцов белых крыс, на основе выявленных закономерностей воссоздать модель угнетения репродуктивной системы в условиях экспериментальной иммобилизации животных.

Материалы и методы исследования

Животных массой 200–220 г подвергали иммобилизации путем помещения их в специальные пластиковые клетки-пеналы на 4 часа ежедневно в течение 30 дней. Эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с требованиями Женевской конвенции (1985). По окончании экспериментальных воздействий в крови измеряли перекисную резистентность эритроцитов (ПРЭ) [6], а также исходный уровень малонового диальдегида (МДА) и кинетические показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях медиобазального гипоталамуса и семенников [10]. Кроме того измеряли

относительные массы гипофиза (мг%) и семенников (%), а также количество дефективных эпидидимальных сперматозоидов [8]. Уровни половых гомонов – тестостерона и лютропина – определяли методом иммуноферментного анализа. Уровень биосинтеза тестостерона оценивали посредством определения ферментативной активности биосинтеза тестостерона – Δ^5-3β-гидроксистероиддегидрогеназы (ГСД) в гомогенатах семенников, используя 3β-гидрокси-5-андростен-17-он в качестве субстрата [7]. Общую активность ГСД выражали у.е. (1 у.е. = 1 мкг образовавшегося за 90 мин. продукта/1 г ткани семенника). Срезы семенников толщиной 7 мкм изготавливали на микротоме «Microm HM – 400» (Германия). Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Полученные препараты изучались на универсальном микроскопе «Nu» (Германия), соединенном с цветной телевизионной камерой «Pixera» (США). Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием критерия Стьюдента (t), различия считали достоверными при $p < 0,05$ [2].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате иммобилизации обнаружено достоверное снижение относительной массы надпочечников ($P < 0,01$), что указывает на развитие затяжной стресс-реакции. В пользу указанного обстоятельства говорит также факт усиления перекисного гемолиза эритроцитов на 33%, в сравнении с контролем ($P < 0,05$), что является следствием интенсификации процессов свободнорадикального окисления (СРО) и, следовательно, развития окислительного стресса (рис. 1).

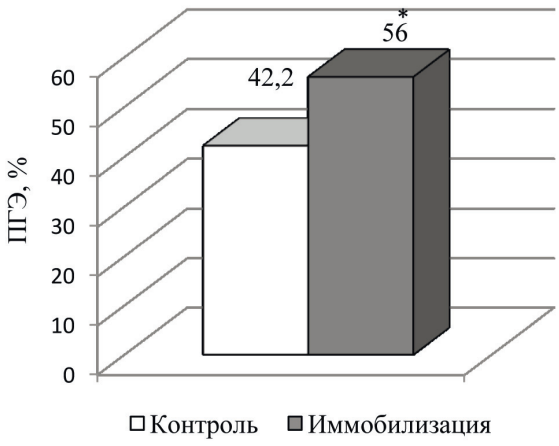


Рис. 1. Изменение уровня перекисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ) в условиях иммобилизационного стресса.
*Примечание: * P < 0,05 – в сравнении с контролем*

В условиях иммобилизационного стресса в ткани семенников отмечалось усиление динамики процессов СРО. Исходный уровень МДА почти в 2 раза превосходил контрольное значение (табл. 1). Кинетические показатели ПОЛ в условиях стресса также достоверно возрастали, особенно асПОЛ.

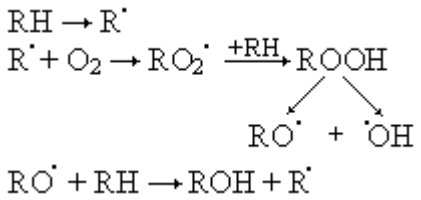
Таблица 1

Изменение показателей ПОЛ в ткани семенников в условиях иммобилизационного стресса

Условия опыта	n	$МДА_{исх}$, нмоль/0,5 г	Кинетические показатели, нмоль МДА/ч	
			спПОЛ	асПОЛ
Контроль	10	4,89 ± 0,151	45,97 ± 0,840	48,74 ± 0,702
Иммобилизация	10	9,85 ± 0,138	64,62 ± 1,030	70,71 ± 1,451
P		P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Как известно, семенники богаты основным субстратом липопероксидации – липидами (насыщенными и ненасыщенными) [5]. Развитие окислительного стресса,

сопряжённого с радикальным окислением ненасыщенного фосфолипида RH, можно выразить следующей схемой:



Усиление процессов липопероксидации должно коррелировать с угнетением функционального состояния органа [3, 4]. Косвенным подтверждением указанного обстоятельства является снижение относительной массы семенников в условиях интенсификации процессов СРО в тестикулярной ткани. Относительная масса семенников в контрольной группе составила величину 0,63 ± 0,058 %, в то время как в экспериментальной группе было зафиксировано значение 0,48 ± 0,025 % (P < 0,05), что достоверно свидетельствует об угнетении функционального состояния семенников. Относительная масса гипофиза в условиях эксперимента также снижалась, что свидетельствует об угнетении функциональной деятельности гипофиза в целом (табл. 2).

Таблица 2

Изменение относительной массы семенников и гипофиза самцов крыс в условиях иммобилизационного стресса

Условия опыта	n	Относительная масса семенников, %	Относительная масса гипофиза, мг %
Контроль	10	0,63 ± 0,058	3,57 ± 0,220
Иммобилизация	10	0,48 ± 0,025	2,95 ± 0,053
P		P < 0,05	P < 0,05

Вместе с тем, в условиях иммобилизационного стресса падение относительной массы семенников было более выражено, чем падение относительной массы гипофиза, о чем свидетельствует отрицательный коэффициент корреляции r = – 0,550. Это означает, что относительно семенников масса гипофиза в условиях иммобилизации имеет тенденцию к приросту. Указанное обстоятельство говорит в пользу угнетения, прежде всего, секреторной функции гипофиза, которая связана с регуляторным влиянием со стороны высшего центра регуляции вегетативных функций – гипоталамуса.

В подтверждение вышесказанного были измерены уровни половых гормонов в плазме крови. Было зафиксировано достоверное падение уровня тестостерона на 38 %, по сравнению с контролем (1,751 ± 0,2460 и 2,829 ± 0,0731 нг/мл соответственно; P < 0,01). Уровень лютропина в условиях иммобилизации был также ниже контрольного значения. Важно отметить коррелятивную связь между падением уровней тестостерона и лютеинизирующего гормона в соответствии коэффициентом положительной корреляции r = +0,601 (табл. 3). Указанное обстоятельство свидетельствует в пользу зависимости функционального состояния гонад от изменений, возникающих на уровне гипоталамо-гипофизарного комплекса – центрального регуляторного механизма физиологических функций.

Таблица 3

Изменение уровней тестостерона и лютропина в условиях иммобилизации

Условия опыта	n	Тестостерон, нг/мл	Лютеинизирующий гормон, мМЕ/мл	Коэффициент корреляции, r
Контроль	6	2,829 ± 0,0731	0,425 ± 0,0538	+ 0,935
Иммобилизация	6	1,751 ± 0,2460	0,327 ± 0,0355	+ 0,601
P		P < 0,01	P > 0,05	

Снижение тестостеронпродуцирующей активности семенников подтверждается фактом падения общей активности фермента Δ^5-3β-гидроксистероиддегидрогеназы (ГСД) более чем в 2 раза, по сравнению с контролем (104,5 ± 6,92 и 236,2 ± 29,33 у.е. соответственно; P < 0,001).

Угнетение секреторной функции аденогипофиза, в свою очередь, можно связать с угнетением функционального состояния

высшего центра регуляции вегетативных функции – гипоталамуса, в медиобазальной и преоптической области которого сосредоточены центры регуляции репродуктивной функции, в частности, супрахиазматическое и аркуатное ядра. Об угнетении функционального состояния гипоталамуса в условиях иммобилизационного стресса свидетельствует факт интенсификации процессов СРО в гипоталамической ткани. В пользу указанного обстоятельства говорит повышение исходного уровня МДА более чем в 2 раза (P < 0,001) и усиленная динамика его накопления в условиях инкубации (рис. 2).

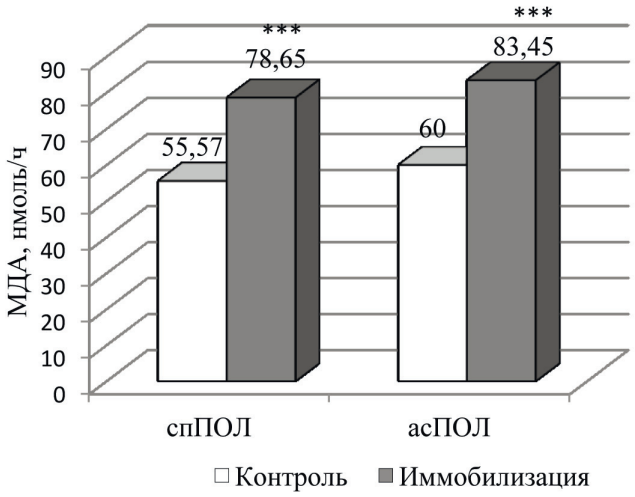


*Рис. 2. Кинетические показатели ПОЛ в условиях иммобилизационного стресса. Примечание: *** P < 0,001 – в сравнении с контролем*

Уровень МДА и кинетические показатели ПОЛ в гипоталамической ткани превышают, однако, таковые в ткани семенников, что вполне естественно, учитывая, что гипоталамус как часть нервной ткани очень богат основным субстратом липопероксидации – липидами [4]. Усиление процессов СРО в гипоталамической ткани отражает факт нарушения его функционального состояния в целом. Учитывая регуляторную роль гипоталамуса в отношении гипофиза, а также современную концепцию стресса К.В. Судакова (1997) [12], можно заключить, что угнетение функционального состояния гипофиза вызвано блокадой выброса рилизинг-факторов в область срединного возвышения, в частности, гонадолиберина. Таким образом, нарушение функционального состояния семенников в условиях пищевого стресса вызвано не только усиленной динамикой процессов СРО в самой тестикулярной ткани, но и угнетающим регуляторным влиянием со стороны гипоталамо-гипофизарного комплекса. Указанное обстоятельство о регуляторном влиянии гипоталамо-гипофизарного комплекса в условиях стресса находится в соответствии с ранними работами Б.В. Алешина и Л.А. Бондаренко (1982), которые связывали угнетение тестикулярного андрогенопоэза в условиях стресса с эндокринными сдвигами в системе гипоталамус-гипофиз [1].

В подтверждение всего вышесказанного был проведён морфологический анализ эпидидимальных сперматозоидов. В условиях проводимого эксперимента визуально отмечено снижение общего количества эпидидимальных сперматозоидов. Процент дефективных форм сперматозоидов в контрольной группе составил 7,0 ± 0,54%, в то время как в опытной группе их количество превосходило более чем в 3,5 раза и составило 24,9 ± 1,19% (P < 0,001). Ведущими нарушениями были облом и потеря хвоста сперматозоидов, что коррелирует с повышенной динамикой процессов СРО в тестикулярной ткани и угнетающим регуляторным влиянием со стороны гипоталамо-гипофизарного комплекса в условиях иммобилизации. Последствия, вызываемые развитием окислительного стресса, позволяют поставить задачу протектирования процесса радикалообразования за счёт использования таких корректирующих агентов, как антиоксиданты [13, 14].

Заключение

Таким образом, экспериментально вызванный иммобилизационный стресс отрицательно сказывается как на инкреторной, так и на экскреторной составляющих мужского репродуктивного аппарата. Вместе с тем, проведённое исследование позволяет заключить, что угнетение функционального

состояния семенников в условиях иммобилизации осуществляется с помощью двух механизмов:

1) за счёт интенсификации процессов СРО в ткани семенников;

2) за счёт изменения регуляторного влияния со стороны гипоталамо-гипофизарного комплекса.

В условиях иммобилизационного стресса наблюдается резкое увеличение общего количества дефективных сперматозоидов, по сравнению с контрольными показателями. Ведущими нарушениями эпидидимальных сперматозоидов в результате иммобилизационного стресса являются облом и потеря хвоста сперматозоидов, а также ухудшение их кинетических свойств. Вследствие развития окислительного стресса, вызванного иммобилизацией, наблюдаются дегенеративные изменения сперматогенного эпителия, проявляющие признаки некроза на фоне компенсаторного разрастания интерстициальной ткани за счёт прироста малых функционально слабых клеток Лейдига.

Список литературы

1. Алешин Б.В., Бондаренко Л.А. К механизму нарушения андрогенопоэза при стрессе // Бюл. экспер. биол. – 1982. – Т. 94, № 7. – С. 98–100.

2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

3. Кондратенко Е.И. Функциональные взаимосвязи эндокринных и свободнорадикаль-ных процессов у крыс разного пола при изменении освещённости: Монография. – Астрахань: Астраханский ун-т, 2003. – 195 с.

4. Мажитова М. В. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная защита разных отделов центральной нервной системы на этапах постнатального онтогенеза белых крыс в норме и при действии промышленных серосодержащих поллютантов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Астрахань, 2012. – 44 с.

5. Николаев А.А., Логинов П.В. Стресс и репродуктивная функция: Монография. – Saar-brücken, Deutschland (Германия): LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. – 142 с.

6. Покровский А.А., Абраров А.А. К вопросу о перекисной резистентности эритроцитов // Вопросы питания. – 1964. – Т. 23, № 6. – С. 44–49.

7. Резніков О.Г., Демченко В.М., Нищименко О.В. Половые гормоны человека // Фізіологічний журнал. – 1976. – № 5. – С. 616–621.

8. Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдалённые последствия влияния химических соединений на организм. – М.: Медицина, 1979. – 232 с.

9. Селиванова Е.А. Влияние иммобилизационного стресса и внутримышечного введения неостигмина на активность ацетилхолинэстеразы и Na,K-АТФазы эритроцитов и головного мозга: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Тюмень, 2006. – 22 с.

10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / под ред. акад. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

11. Степанчук В.В. Иммобилизационный стресс и хроноритмы гуморального иммунитета у белых крыс // Здоровье и образование в XXI веке. – 2013. – Т. 15, № 1–4. – С. 227–229.

12. Судаков К.В. Новые акценты классической концепции стресса // Бюл. экспер. биол. – 1997. – Т. 123, № 2. – С. 124–130.

13. Agarwal A., Prabakaran S.A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology // Indian Journal of Experimental Biology. – 2005. – Vol. 43, № 11. – P. 963–974.

14. Zini A., Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? // Asian J. Androl. – 2011. – Vol. 13, № 3. – P. 374–381.

References

1. Aleshin B.V., Bondarenko L.A. Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 1982, Vol. 94, no. 7, pp. 98–100.

2. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika [Biomedical Statistics]. Moscow, Practice Publ., 1999. 459 p.

3. Kondratenko E.I. Monografiya «Funktsionalnye vzaimosvyazi endokrinnykh i svobod-noradikalnykh protsessov u krys raznogo pola pri izmenenii osveschennosti» [Monograf «Functional interrelations of endocrine and free radical processes in rats under conditions of different lighting»]. Astrakhan, Astrakhan State University Publ., 2003. 195 p.

4. Mazhitova M.V. Avtoreferat dissertatsii doktora biologicheskikh nauk «Svobod-noradikalnye protsessy i antioksidantnaya zaschita raznykh otdelov tsentralnoy nervnoy sistemy na etapakh postnatalnogo ontogeneza belykh krys v norme i pri deystvii promyshlen-nykh serosoderzhaschikh pollutantov» [The abstract of Dissertation of the D.Sc. (Biology) «Free radical processes and antioxidant protection of different parts of central nervous system at the stages of postnatal ontogenesis in white rats in norm and under the influence of industrial pollutants containing sulphur»]. Astrakhan, 2012. 44 p.

5. Nikolaev A.A., Loginov P.V. Monografiya «Stress i reproduktivnaya funktsiya» [Monograf «Stress and reproductive function»]. Saarbrücken, Deutschland, LAP LAMBERT Academic Publ., 2013. 142 p.

6. Pokrovskiy A.A., Abrarov A.A. K voprosu o perekisnoy rezistentnosti eritrotsitov [On the peroxide resistance of erythrocytes]. Voprosy pitaniya [Nutrition Issues], 1964, vol. 23, no. 6, pp. 44–49.

7. Reznikov O.G., Demchenko V.M., Nischimenko O.V. Fiziologichnij zhurnal [Physiological Journal], 1976, no. 5, pp. 616–621.

8. Sanotskiy I.V., Fomenko V.N. Otdalennye posledstviya vliyaniya khimicheskikh soedineniy na organism [The long-term effects of exposure to chemicals on the body]. Moscow, Meditsina Publ., 1979, 232 p.

9. Selivanova E.A. Avtoreferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk «Vliyanie immobi-lizatsionnogo stressa i vnutrimyshechnogo vvedeniya neostigmina na aktivnost atsetilkholinesterazy i Na,K-ATFazy eritrotsitov i golovnogo mozga» [The abstract of disser-tation of candidate of biological sciences «The influence of immobilization stress and intramuscular injection of neostigmine on acetylcholine activity and erythrocyte and brain Na,K-ATPase»]. Tumen, 2006. 22 p.

10. Stalnaya I.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoschyu ti-obarbiturovoj kisloty [Method for determinating malonic dialdehyde using the thiobarbituric acid]. Sovremennye metody v biokhimii [Modern methods in biochemistry]. Moscow, Meditsina Publ., 1977, pp. 66–68.

11. Stepanchuk V.V. Zdorove i obrazovanie v XXI veke [Health and Education Millenium], 2013, vol. 15, no. 1-4, pp. 227–229.

12. Sudakov K.V. Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 1997, vol. 123, no. 2, pp. 124–130.

13. Agarwal A., Prabakaran S.A. Indian Journal of Experimental Biology, 2005, vol. 43, no. 11, pp. 963–974.

14. Zini A., Al-Hathal N., Asian J. Androl., 2011, vol. 13, no. 3, pp. 374–381.

Рецензенты:

Великородов А.В., д.х.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии Астраханского государственного университета, г. Астрахань;

Бойко О.В., д.м.н., профессор кафедры биохимии с курсом лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 08.09.2014.