

УДК 616.69-008.6-003.219:591.463.1

**КОРРЕКЦИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА НА МОДЕЛИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ
ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
СЕРОВОДОРОДСОДЕРЖАЩИМ ПРИРОДНЫМ ГАЗОМ**

Логинов П.В., Николаев А.А.

*ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru*

Целью работы явилось изучение корректирующих эффектов селенсодержащего биокомплекса, состоящего из селенена и аскорбиновой кислоты, на морфофункциональное состояние семенников животных в условиях воздействия Астраханского сероводородсодержащего природного газа. Самцов белых крыс массой 200 ± 10 г подвергали воздействию газом. Корректирующие свойства биокомплекса оценивали по уровню липопероксидации в ткани семенников, а также по морфокинетическим показателям эпидидимальных сперматозоидов. О развитии оксидативного стресса свидетельствует снижение относительной массы надпочечников и возрастание перекисного гемолиза эритроцитов в условиях воздействия газом. Возрастал уровень малонового диальдегида и кинетические показатели ПОЛ в ткани семенников. Селенсодержащий биокомплекс способствовал снижению уровня липопероксидации в условиях интоксикации газом. В семенных канальцах присутствовали различные сперматогенные клетки, высота сперматогенного эпителия заметно возросла. Имело место восстановление пула незрелых форм сперматогенных клеток (сперматогонии и сперматоциты). Количество эпидидимальных сперматозоидов у животных, подвергавшихся воздействию газом и получавших биокомплекс, не отличалось достоверно от контрольных значений. Наблюдалось некоторое улучшение морфокинетических характеристик сперматозоидов в сравнении с группой животных, подвергавшихся воздействию только газом. Таким образом, коррекция сперматогенеза осуществлялась как за счет снижения интенсивности процессов свободнорадикального окисления в ткани семенников, так и за счет внедрения атомов селена в структуру пептидов, образующих хвостовую часть сперматозоидов.

Ключевые слова: эпидидимальные сперматозоиды, сперматогенные клетки, малоновый диальдегид, сперматогенный эпителий, антиоксиданты, селен

**SPERMATOGENESIS CORRECTION IN THE MODEL OF EXPERIMENTAL
ANIMALS UNDER CONDITIONS OF CHRONIC INTOXICATION
WITH NATURAL GAS CONTAINING HYDROGEN SULFIDE**

Loginov P.V., Nikolaev A.A.

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

The purpose of the paper was to study the correcting effects of the selenium-containing biocomplex, consisting of selenen and ascorbic acid, on morphofunctional state of testes in animals exposed by the Astrakhanian natural gas containing hydrogen sulfide. White male rats weighing 200 ± 10 g were subjected with the gas. The correcting properties of the biocomplex were estimated by the peroxidation level in testicular tissue and morphokinetic indexes of epididymal spermatozoa. The adrenal gland weight decrease and the peroxide haemolysis increase testify to oxidative stress development under conditions of the gas exposure. In testicular tissue, the malonic dialdehyde level and kinetic indexes of LPO increased. The selenium biocomplex helped reduce the lipoperoxidation level under conditions of the gas intoxication. In the seminiferous tubules, different spermatogenic cells were present, the spermatogenic epithelium height was increased significantly. The pool restoration of immature forms of spermatogenic cells (spermatogonia and spermatocytes) took place. The total number of epididymal spermatozoa in the animals exposed by the gas on the background of selenium rich diet did not differ from that of the control group. The certain improvement in morphokinetic characteristics of spermatozoa was observed in comparison with the group of animals exposed by the gas only. Thus, the spermatogenesis correction was realized due to decreasing the intensity of free radical oxidation and introduction of selenium in the structure of the peptides composing the tail part of spermatozoa. The ascorbic acid showed the antioxidant properties and participated in regulation of selenium level in tissues.

Keywords: epididymal spermatozoa, spermatogenic cells, malonic dialdehyde, spermatogenic epithelium, antioxidants, selenium

Природный газ Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ) представляет собой чрезвычайно сложную химическую систему, уникальность которой обусловлена высоким содержанием серы и в особенности сероводорода [1, 4]. Высокая токсичность сероводорода делает

Астраханский природный газ чрезвычайно агрессивным агентом, вызывающим развитие окислительного стресса [2, 6]. Последнее обстоятельство является причиной возникновения функциональных нарушений многих систем организма. В последнее время все больше внимания уделяется

исследованию влияния сероводородсодержащего газа Астраханского газоконденсатного месторождения на репродуктивную систему мужчин [7, 8, 13], поскольку большая часть рабочего контингента на Астраханском газоконденсатном комплексе – мужчины, что определяет исследование именно мужской репродуктивной системы. Вместе с тем в литературе приводится мало сведений, касающихся профилактики нарушений репродуктивной функции в условиях стресса. В исследованиях последних лет говорится о протекторных свойствах антиоксидантов в условиях развития окислительного стресса. Это касается, прежде всего, функциональных возможностей такого классического антиоксиданта, как витамин Е [15]. Однако об альтернативных корректорах репродуктивной функции в условиях интенсификации процессов свободнорадикального окисления (СРО) говорится мало.

Целью настоящей работы является изучение корректирующих эффектов селенсодержащего биокомплекса, состоящего из селексена и аскорбиновой кислоты, на морфофункциональное состояние семенников экспериментальных животных в условиях воздействия сероводородсодержащим газом АГКМ.

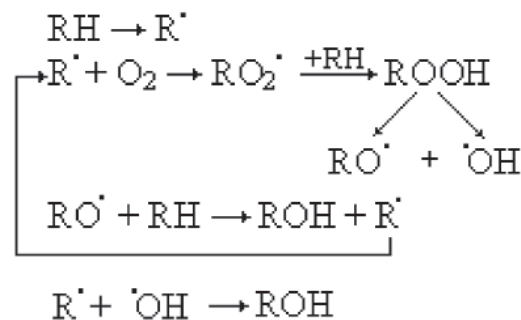
Материалы и методы исследования

Для исследования взяли 40 половозрелых самцов белых крыс массой 200 ± 10 г. Эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с требованиями Женевской конвенции (1985). Животные были разделены на 4 группы: одна контрольная (К) и три опытные. В первую опытную группу (О-1) вошли животные, получавшие перорально селексен в сочетании с аскорбиновой кислотой в дозах соответственно 1,5 и 500 мг/кг массы тела животного в сутки в течение 50 дней. Группу О-2 составили животные, подвергавшиеся воздействию сероводородсодержащим газом (СВСГ) с концентрацией 10 мг/м^3 по сероводороду в течение 30 дней по 4 часа ежедневно. В группу О-3 вошли животные, получавшие селексен в сочетании с аскорбиновой кислотой в указанных дозах в течение 50 дней, а параллельно с третьей недели введения указанных препаратов подвергавшиеся воздействию СВСГ в указанной концентрации в течение 30 дней по 4 часа ежедневно. По окончании экспериментальных воздействий в крови определяли уровень перекисного гемолиза эритроцитов [9]. В ткани семенников определяли исходный уровень малонового диальдегида (МДА) и кинетические показатели ПОЛ [12]. Состояние сперматогенеза у животных оценивали по методу, предложенному В.П. Маминой и Д.И. Семеновым [5]. Эпидидимальные сперматозоиды извлекали из хвостовой части эпидидимисов, разрезая их вдоль, семенную жидкость вымывали дозированным количеством физиологического раствора (эмпирически для крыс это количество 2–4 мл) и получали

суспензию [11]. Подсчёт общего числа эпидидимальных сперматозоидов в суспензии производили в камере Горяева под окуляром светового микроскопа при увеличении 600х. Число спермиев подсчитывали в 5 больших квадратах камеры Горяева по диагонали. Кроме того, определяли процентное соотношение между различными морфологическими формами сперматозоидов (дефективные, подвижные и мёртвые). Для общей оценки морфофункционального состояния тестикулярной ткани изготавливали срезы семенников толщиной 7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием критерия Стьюдента (t), различия считали достоверными при $p < 0,05$ [3].

Результаты исследования и их обсуждение

Под действием СВСГ АГКМ обнаружено достоверное снижение относительной массы надпочечников ($P < 0,01$), что указывает на развитие затяжной стресс-реакции. В пользу указанного обстоятельства свидетельствует также усиление перекисного гемолиза эритроцитов на 23,1%, по сравнению с контрольной группой ($65,3 \pm 3,44$ и $42,2 \pm 3,49\%$ соответственно), что отражает факт интенсификации процессов СРО в крови и развитие окислительного стресса. Развитие окислительного стресса, сопряжённого с радикальным окислением ненасыщенного фосфолипида RH, можно выразить следующей схемой [6]:



В условиях воздействия СВСГ АГКМ в ткани семенников отмечалось усиление динамики процессов СРО. Исходный уровень МДА в 1,5 раза превосходил контрольное значение (табл. 1). Кинетические показатели ПОЛ в условиях стресса также достоверно возрастали, особенно асПОЛ. Вместе с тем селенсодержащий биокомплекс (селексен + аскорбиновая кислота) способствовал снижению исходного уровня МДА как при воздействии СВСГ, так и в его отсутствие, что указывает на проявление указанным биокомплексом антиоксидантных свойств (рис. 1).

Таблица 1

Изменение показателей ПОЛ в ткани семенников в условиях воздействия сероводородсодержащим газом АГКМ

Условия опыта	n	МДА _{исх} , нмоль/0,05 г	Кинетические показатели, нмоль МДА/ч	
			спПОЛ	асПОЛ
Контроль	10	4,89 ± 0,151	45,97 ± 0,840	48,74 ± 0,702
СВСГ АГКМ	10	7,42 ± 0,457	65,36 ± 3,104	76,48 ± 2,431
P		P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

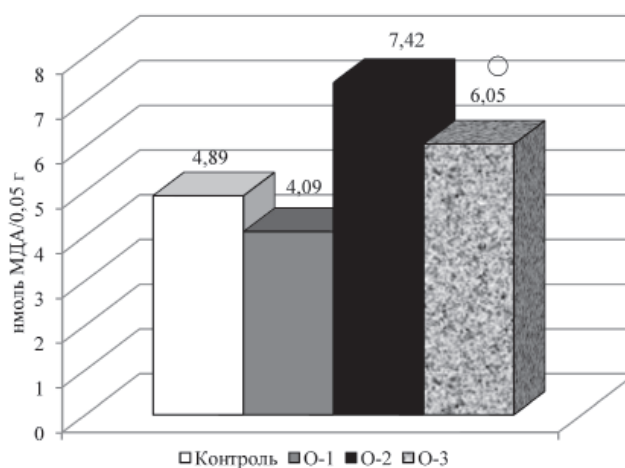


Рис. 1. Исходный уровень МДА под действием СВСГ АГКМ, селенсодержащего биокомплекса и их сочетания:

○ – P < 0,05 – в сравнении с группой животных, подвергнутых воздействию газом

В условиях воздействия сероводородсодержащим газом наблюдался отёк интерстициальной ткани, полнокровие сосудов семенников и гибель половых клеток. Семенные каналцы располагались на значительном расстоянии друг от друга. Наблюдалось отслоение базальной мембраны и хаотичное расположение клеток сперматогенного эпителия (а в ряде случаев и вообще запустевание семенных каналцев). Количество клеток

Лейдига возрастает примерно в 3 раза за счёт компенсаторного прироста функционально слабых малых клеток (незрелых и инволюционирующих) (рис. 2). Предварительное введение селенсодержащего биокомплекса способствует заметному снижению токсических эффектов, вызываемых одним только токсикантом, что коррелирует с изменением динамики процессов СРО в различных экспериментальных условиях (рис. 3).

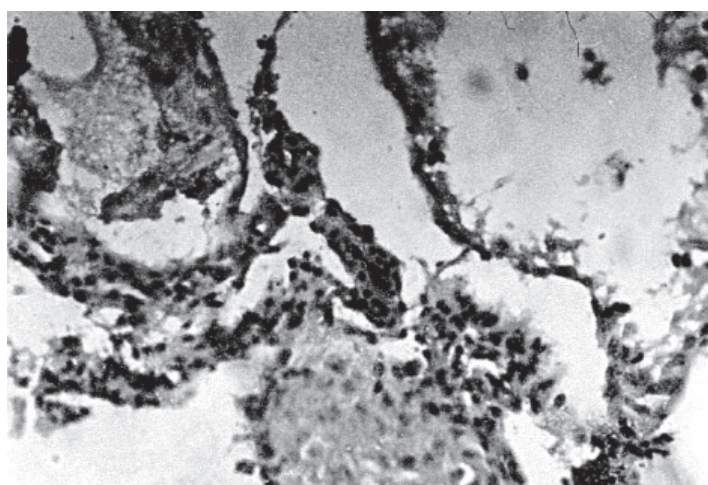


Рис. 2. Структура извитых каналцев семенников животных, подвергнутых воздействию сероводородсодержащим газом. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 200x

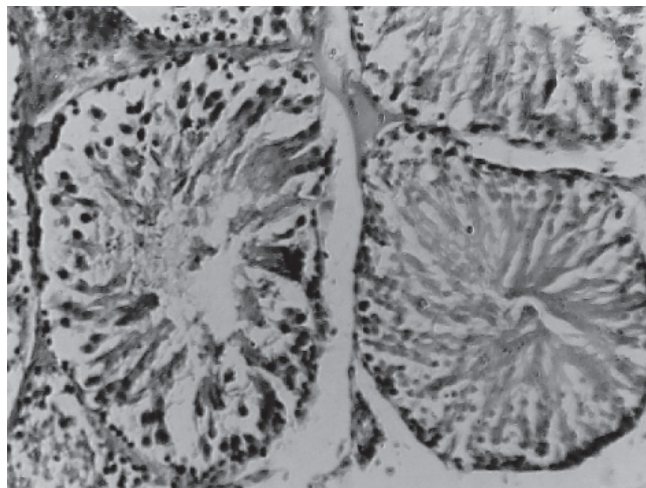


Рис. 3. Структура извитых канальцев семенников крыс, подвергавшихся воздействию сероводородсодержащим газом и получавших селенсодержащий биокомплекс. Окраска гематоксилин-эозином. Увел. 200х

Под влиянием сероводородсодержащего газа (опытная группа О-2) отмечалось резкое уменьшение общего количества сперматогенных клеток более чем в 7 раз. Наблюдалось выраженное нарушение соотношения между сперматогенными клетками (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды). Содержание сперматогоний и сперматозоидов было сниженным, преобладали сперматоциты и сперматиды. Таким образом, незрелые половые клетки сперматогонии оказались наиболее уязвимым звеном сперматогенеза. Анализ состояния сперматогенеза после воздействия

газа на фоне приема селенсодержащего биокомплекса (опытная группа О-3) показал улучшение показателей сперматогенеза, по сравнению с таковыми в группе О-2. Относительное количество сперматогоний и сперматоцитов возросло, что свидетельствует о восстановлении пула незрелых половых клеток под влиянием селенсодержащего биокомплекса в условиях интоксикации газом (табл. 2).

Количество и морфофункциональное состояние эпидидимальных сперматозоидов у белых крыс в норме и в условиях экспериментальных воздействий отражено в табл. 3.

Таблица 2

Состояние сперматогенеза у крыс после воздействия сероводородсодержащим газом

Тестикулярные показатели сперматогенеза	Контроль (n = 10)	Опытная группа О-2 (n = 10)	Опытная группа О-3 (n = 10)
Общее количество сперматогенных клеток, млн	5236 ± 360,0	720 ± 38,1	2250 ± 116,5
Сперматогонии, %	22,5 ± 1,52	14,3 ± 0,81	17,6 ± 1,02
Сперматоциты, %	20,7 ± 1,67	28,6 ± 1,88	34,2 ± 2,46
Сперматиды, %	21,6 ± 1,76	35,7 ± 2,59	20,3 ± 1,60
Сперматозоиды, %	35,2 ± 2,66	21,4 ± 1,80	27,9 ± 1,41

Таблица 3

Состояние эпидидимальных сперматозоидов у крыс под действием сероводородсодержащего газа, селенсодержащего биокомплекса и их сочетания

Показатели эпидидимальных сперматозоидов	Контроль (n = 10)	Группа О-1 (n = 10)	Группа О-2 (n = 10)	Группа О-3 (n = 10)
Общее количество, млн	50,0 ± 6,51	54,3 ± 6,0	***28,4 ± 2,44	ΔΔ41,0 ± 4,51
Дефективные, %	20,2 ± 2,22	***13,1 ± 0,62	***44,4 ± 3,83	ΔΔΔ42,0 ± 3,52
Подвижные, %	81,0 ± 6,2	88,0 ± 6,11	***0,4 ± 0,12	ΔΔΔ54,5 ± 4,22
Мёртвые, %	4,8 ± 0,82	4,7 ± 0,72	***55,2 ± 4,11	45,4 ± 3,31

Примечания: *** P < 0,001 – в сравнении с контролем; Δ P < 0,01; ΔΔ P < 0,001 – в сравнении с группой животных, подвергнутых воздействию газом (О-2).

У животных, подвергнутых воздействию газом, отмечено резкое уменьшение общего количества эпидидимальных сперматозоидов более чем в 1,7 раз, в сравнении с контролем ($P < 0,001$). В популяции сперматозоидов отмечалось увеличение процентного содержания дефективных форм (44,4%), подвижные сперматозоиды почти отсутствовали (0,4%). Также почти в 11,5 раз увеличилось содержание мёртвых сперматозоидов (55,2%) по сравнению с контролем (4,8%) ($P < 0,001$). Отсутствие подвижности сперматозоидов связано с таким дефектом, как облом хвоста сперматозоидов, что можно объяснить усилением процесса липопероксидации в условиях развития окислительного стресса, вызванного сероводородсодержащим газом. Вместе с тем предварительное потребление животными селенсодержащего биокомплекса способствовало снижению токсических эффектов сероводородсодержащего газа. Достоверно значимых отклонений от контроля по количеству эпидидимальных сперматозоидов у животных, подвергавшихся воздействию газом и предварительно получавших указанный биопротектор, нами не было зафиксировано. В группе животных, подвергавшихся воздействию газом и предварительно получавших селенсодержащий комплекс, наблюдалось некоторое улучшение морфокинетических характеристик сперматозоидов в сравнении с группой животных, подвергавшихся воздействию только газом.

Известно, что в хвосте сперматозоидов крыс содержится селенопептид, который имеет важное структурное значение при сборке хвоста сперматозоидов [10, 13]. В условиях хронического воздействия сероводородсодержащего газа селен, очевидно, частично замещается серой, имеющей сходство с селеном, что в конечном счете отрицательно сказывается на функциональном состоянии половых клеток. Соответственно, у животных, получавших на фоне воздействия газом органический селен, последний успешно конкурировал с серой за место в селенопептиде, и вследствие этого значительно сокращалось относительное содержание дефективных сперматозоидов и улучшались двигательные характеристики эпидидимальных сперматозоидов.

Таким образом, селенсодержащий биокомплекс, включающий в себя аскорбиновую кислоту и селексен, оказывает протекторный эффект в отношении сперматогенной функции в условиях многократного воздействия сероводородсодержащим газом. Коррекция сперматогенеза достигается двумя путями:

1) за счет снижения интенсивности процессов СРО в ткани семенников;

2) за счет внедрения атомов селена в структуру пептидов, образующих хвостовую часть сперматозоидов.

Аскорбиновая кислота, будучи звеном неферментативной цепи антиоксидантной системы, способствует снижению уровня липопероксидации в тестикулярной ткани, что благотворно в целом сказывается на общем функциональном состоянии. Вместе с тем аскорбиновая кислота способна регулировать уровень селена в организме и выводить его избыток из организма [14]. Селен в органической форме эффективно себя проявляет как строительный материал половых клеток. Кроме того, селен является необходимым компонентом селенсодержащей глутатионпероксидазы, выступающей в качестве звена ферментативной цепи антиоксидантной системы.

Список литературы

1. Асфандияров Р.И., Бучин В.Н., Лазько А.Е. и др. Острые отравления серосодержащими газами: Монография. – Астрахань: Волга, 1995. – 156 с.
2. Ветошкин Р.В., Николаев А.А., Логинов П.В. Изменения протеогликанов и гликозаминогликанов семенников крыс при экспериментальной хронической интоксикации серосодержащим газом // Проблемы репродукции. – 2012. – Т. 18, № 2. – С. 15–17.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Логинов П.В., Николаев А.А. Влияние сероводородсодержащего газа Астраханского газового месторождения на биохимические показатели функционального состояния семенников белых крыс // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 76–81.
5. Мамина В.П., Семенов Д.И. Метод определения количества сперматогенных клеток семенника в клеточной суспензии // Цитология. – 1976. – Т. 18, № 7. – С. 913–914.
6. Николаев А.А., Логинов П.В., Ветошкин Р.В. Участие свободных радикалов в функции сперматозоидов // Астраханский медицинский журнал. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 23–29.
7. Николаев А.А., Луцкий Д.Л. Влияние экологических факторов на репродуктивную функцию мужчин // Эколого-физиологические проблемы адаптации: мат-лы VIII Междунар. симпозиума, Москва, 27–30 января 1998 г. – М.: Изд-во РУДН, 1998. – С. 79.
8. Плосконос М.В., Николаев А.А. Содержание свободных полиаминов в спермоплазме фертильных и субфертильных мужчин // Проблемы репродукции. – 2010. – № 3. – С. 80–82.
9. Покровский А.А., Абраров А.А. К вопросу о перекисной резистентности эритроцитов // Вопросы питания. – 1964. – Т. 23, № 6. – С. 44–49.
10. Полуниин А.И., Луцкий Д.Л., Мирошников В.М. и др. Селен и цинк в коррекции мужской субфертильности. – Астрахань: Изд-во АГМА, 2002. – 42 с.
11. Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. – М.: Медицина, 1979. – 232 с.
12. 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.

13. Ушакова М.В. Функционирование репродуктивной системы самцов крыс при хроническом воздействии природных токсикантов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Астрахань, 2002. – 22 с.

14. Bebne D. Studies in the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins // *Analyst*. – 1995. – Vol. 120. – P. 823–825.

15. Loginov P.V., Teply D.L. Morphofunctional state of reproductive system in male rats under conditions of immobilization stress // *Естественные науки*. – 2014. – № 4(49). – С. 47–54.

References

1. Asfandijarov R.I., Buchin V.N., Lazko A.E. i dr. *Mono-grafiya «Ostrye otravleniya serosoderzhashimi gazami»* [Monograph «Acute intoxication by sulfur-containing gases»]. Astrakhan, Volga Publ., 1995. 156 p.

2. Vetoshkin R.V., Nikolaev A.A., Loginov P.V. *Problemy reprodukcii* [Reproduction problems], 2012, vol. 18, no. 2, pp. 15–17.

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

4. Loginov P.V., Nikolaev A.A. *Astrahanskij medicinskij zhurnal* [Astrakhan Medical Journal], 2011, vol. 6, no. 2, pp. 76–81.

5. Mamina V.P., Semenov D.I. *Citologija* [Cytology], 1976, vol. 18, no. 7, pp. 913–914.

6. Nikolaev A.A., Loginov P.V., Vetoshkin R.V. Uchastie svobodnyh radikalov v funkcii spermatozoidov [Free radical participation in spermatozoid function]. *Astrahanskij medicinskij zhurnal* [Astrakhan Medical Journal], 2014, vol. 9, no. 1, pp. 23–29.

7. Nikolaev A.A., Luckij D.L. *Materialy VIII Mezhdunarodnogo simpoziuma «Jekologo-fiziologicheskie problemy adaptacii»* [Materials of the 8th International Symposium «Ecological and physiological problems of adaptation»]. Moscow, 1998, pp. 79.

8. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. *Problemy reprodukcii* [Reproduction problems], 2010, no. 3, pp. 80–82.

9. 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.

10. Polunin A.I., Lutskiy D.L., Miroshnikov V.M., Nikolaev A. A. *Selen i tsink v korrektsii muzhskoy subfertil'nosti* [Selenium and zinc in male subfertility correction]. Astrakhan, ASMA Publ., 2002. 42 p.

11. 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.

12. Stalnaya I.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoschyu tiobarbiturovoj kisloty [Method for determining malonic dialdehyde using the thio-barbituric acid]. *Sovremennye metody v biokhimii* [Modern methods in biochemistry]. Moscow, Meditsina Publ., 1977, pp. 66–68.

13. Ushakova M.V. *Avtoferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk «Funkcionirovanie reproduktivnoy sistemy samcov krys pri hronicheskom vozdejstvii prirodnyh toksikantov»* [The abstract of dissertation of candidate of biological sciences «Functioning of reproductive system in male rats under chronic exposure of natural toxicants»]. Astrakhan, 2002. 22p.

14. Bebne D. *Analyst*, 1995, vol. 120, pp. 823–825.

15. Loginov P.V., Teply D.L. Morphofunctional state of reproductive system in male rats under conditions of immobilization stress. *Yestestvennye nauki* [Natural Sciences], 2014, no. 4(49), pp. 47–54.

Рецензенты:

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

Бойко О.В., д.м.н., профессор кафедры биохимии с курсом лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 02.03.2015.