doi: 10.17116/kurort20153?-?

Ультраструктурные проявления регенеративных процессов в клетках Сертоли при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях стресса у крыс

Ю.Н. КОРОЛЕВ, М.С. ГЕНИАТУЛИНА, Л.А. НИКУЛИНА, Л.В. МИХАЙЛИК

ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Минздрава России, ул. Новый Арбат, 32, Москва, Российская Федерация, 121099

The ultrastructural manifestations of the regenerative processes in the Sertoli cells under the action of low-intensity electromagnetic radiation in the rats subjected to stress

YU.N. KOROLEV, M.S. GENIATULINA, L.A. NIKULINA, L.V. MIKHAILIK

Federal state budgetary institution «Russian Research Centre of Medical Rehabilitation and Balneotherapy», Russian Ministry of Health, ul. Novy Arbat, 32, Moscow, Russian Federation, 121099

В экспериментах на беспородных крысах-самцах с помощью метода электронной микроскопии было установлено, что применение низкоинтенсивного электромагнитного излучения (НИЭМИ) сверхвысокой частоты (плотность потока мощности меньше 1 мкВт/см^2, частота около 1000 МГц) в режимах первичной профилактики и лечебно-профилактического воздействия ограничивало развитие постстрессорных ультраструктурных нарушений и повышало активность регенеративных процессов в клетках Сертоли. Показано, что развивающиеся адаптационно-компенсаторные сдвиги в клетках Сертоли особенно четко проявлялись со стороны энергопродуцирующих структур — митохондрий — в виде увеличения их средней и суммарной площади. Возрастало также содержание гранулярной эндоплазматической сети и рибосом, улучшались внутриклеточные взаимосвязи между органеллами, укреплялись резервные возможности клеток. Предполагается, что выявленные эффекты обусловлены взаимодействием как местных, так и общих механизмов регуляции.

Ключевые слова: клетки Сертоли, внутриклеточная регенерация, ультраструктурные изменения, низкоинтенсивное электромагнитное излучение, иммобилизационный стресс.

The experiments on the outbred female rats using the electron microscopic technique have demonstrated that the application of ultrahigh frequency low-intensity electromagnetic radiation (LIEMR) with a flux density below 1 mcW/cm^2 and a frequency of approximately 1,000 MHz in the regime of primary prophylaxis and therapeutic-preventive action suppressed the development of the post-stress pathological ultrastructural changes and increased the activity of the regenerative processes in the Sertoli cells. It was shown that the developing adaptive and compensatory changes in the Sertoli cells most frequently involve the energy-producing structures (mitochondria) that undergo the enlargement of their average and total dimensions. Simultaneously, the amount of granular endoplasmic reticulum and the number of ribosomes increased while the intracellular links between the organelles strengthened and the reserve potential of the cells improved. It is concluded that the observed effects may be due to the action of both local and systemic regulation mechanisms.

Key words: Sertoli cells, intracellular regeneration, ultrastructural changes, low-intensity electromagnetic radiation, immobilization stress.

В ранее проведенном исследовании было показано, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение (НИЭМИ) сверхвысокой частоты оказывает антиоксидантное и иммуномодулирующее действие в условиях острого иммобилизационного стресса [1]. Однако влияние этого фактора на организм, особенно на органы репродуктивной системы, остается еще малоисследованным. Для выявления и уточнения механизма действия НИЭМИ необходимо проведение экспериментальных исследований на субклеточном уровне, что даст возможность оценить характер развития внутриклеточных регенеративных процессов в условиях стресса. В этом плане особый интерес представляют изменения со стороны специфических ультраструктур — энергопродуцирующих и белоксинтезирующих органелл, во многом определяющих адаптационный потенциал клетки. В семенниках та-

© Коллектив авторов, 2015

Сведения об авторах:

Королев Юрий Николаевич — д.м.н., проф., зав. лаб. экспериментальных исследований отд. диагностических технологий; *Гениатулина Мариям Сабировна* — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных исследований; *Никулина Людмила Анатольевна* — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных исследований; *Михайлик Любовь Васильевна* — н.с. лаб. экспериментальных исследований

кой анализ целесообразно провести на клетках Сертоли (сустентоцитах), которые выполняют широкие и разнообразные функции в регуляции процессов сперматогенеза. В частности, эти клетки обеспечивают реализацию многих гормональных воздействий на семенники и осуществляют синтез специфических белков [2].

Цель данной работы — выявить ультраструктурные проявления регенеративных процессов в клетках Сертоли у крыс при иммобилизационном стрессе и при действии НИЭМИ.

Исследования были проведены на 27 белых нелинейных крысах-самцах массой 180—220 г. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Крысы были разделены на 5 групп:

1-я группа (опытная) — предварительное применение НИЭМИ (первичная профилактика) с последующим воздействием иммобилизационного стресса; 2-я группа (контроль к 1-й группе) — применение ложных процедур НИЭМИ (без включения аппарата) и воздействие иммобилизационного стресса; 3-я группа (опытная) — воздействие иммобилизационного стресса с последующим применением НИЭМИ (лечебно-профилактическое применение); 4-я группа (контроль к 3-й группе) — воздействие иммобилизационного стресса и ложных процедур НИ ЭМИ; 5-я группа (интактная) — животные никаким воздействиям не подвергались.

Иммобилизационный стресс осуществляли по методике Г. Селье однократным привязыванием крыс в течение 6 ч в положении на спине. Процедуры НИЭМИ проводили от аппарата Акватон-2 (ООО «Телемак», Саратов), плотность потока мощности меньше 1 мкВт/см^2, частота около 1000 МГц. Всего на курс 8 процедур, время воздействия 2 мин. Животные облучались с расстояния 2—3 см от поверхности кожи поясничной области. Забой животных проводили через 1 день после действия стресса при первичной профилактике и через 9 дней при лечебно-профилактическом применении НИЭМИ. Для электронно-микроскопических исследований семенники фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере (pH 7,4), постфиксировали в 1% OsO_4. После обезвоживания в серии спиртов и ацетона образцы заключали в смесь эпон-аралдит. На ультратоме Reichert (Австрия) получали ультратонкие срезы. Исследование образцов проводили на электронном микроскопе Libra 120 (Германия) с программой Carl Zeiss SMT Nano Texnology system Divizion, которая включает в себя как режим трансмиссионного исследования, так и математическую обработку внутриклеточных структур. На ультраструктурном уровне проводили морфометрический анализ митохондрий (Мх) в клетках Сертоли (количество, средняя и суммарная площади), а также подсчитывали число клеток Сертоли с различным уровнем содержания белоксинтезирующих органелл — гранулярной эндоплазматической сети, рибосом и полисом. Для статистической обработки полученных данных использовали критерий Стьюдента.

У животных контрольной группы через 1 сут после воздействия стресса в клетках Сертоли наблюдались явления межклеточного и, реже, внутриклеточного отеков, деструкция митохондрий (Мх), фрагментация гранулярной эндоплазматической сети с выраженным снижением числа прикрепленных и свободных рибосом **(рис. 1, а)**. К 9-м суткам после действия стресса ультраструктурные признаки постстрессорных нарушений в целом сохранялись, а по ряду показателей становились более выраженными. В частности, местами усиливался межклеточный и особенно внутриклеточный отек, чаще обнаруживались дегенеративные формы Мх в виде миелиноподобных структур, в отдельных клетках выявлялись расширенные цистерны эндоплазматической сети, которые, сливаясь между собой, образовывали крупные полости. Выявленные ультраструктурные нарушения свидетельствовали об ослаблении биоэнергетических и белоксинтезирующих процессов, развитии дезадаптационных расстройств и снижении резервных возможностей клеток Сертоли. По-видимому, эти сдвиги в той или иной степени были связаны с повышенной проницаемостью собственной оболочки извитых семенных канальцев [3, 4]. Вместе с тем наряду с повреждениями ультраструктур обнаруживались также и признаки внутриклеточной регенерации, которые более четко проявлялись со стороны митохондриального аппарата. При этом уже через 1 сут после стресса возрастало количество Мх ($p<0,01$), однако в связи с резким снижением их размеров (почти в 3 раза, $p<0,01$), суммарная площадь Мх уменьшалась на 44,3% по сравнению с таковой у интактных животных ($p<0,01$) **(см. таблицу)**. Практически та же закономерность в реакциях Мх сохранялась и к 9-м суткам эксперимента. Следовательно, после действия стресса прирост новообразованных мелких Мх в клетках Сертоли у животных контрольных групп не обеспечивал необходимого уровня биоэнергетических процессов для развития полноценных адаптационно-компенсаторных реакций, направленных на восстановление возникших нарушений.

Применение НИЭМИ в условиях первичной профилактики и при лечебно-профилактическом воздействии способствовало снижению выраженности ультраструктурных нарушений в клетках Сертоли и повышению активности внутриклеточной регенерации, которая развивалась на фоне отчетливого улучшения процессов микроциркуляции [1]. Наиболее выраженные сдвиги отмечались со сторо-

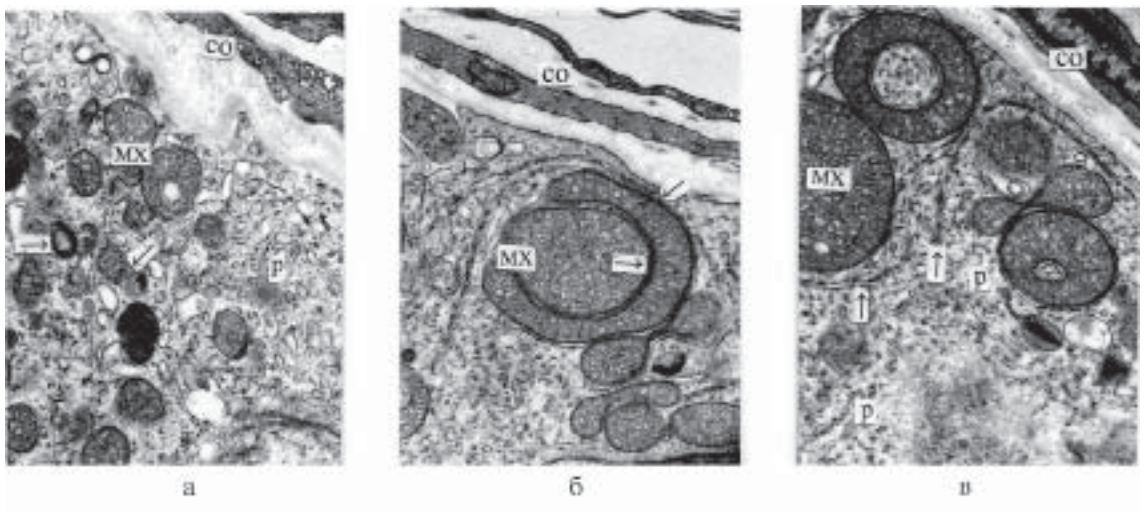

Рис. 1. **Ультраструктура клеток Сертоли семенников крыс при иммобилизационном стрессе и действии НИЭМИ.**

со — собственная оболочка извитого канальца; мх — митохондрии; р — рибосомы и полисомы; а — иммобилизационный стресс. Контроль. Утолщение собственной оболочки семенного канальца. Деструктивные изменения митохондрий (стрелки), единичные гранулы рибосом и полисом; б — иммобилизационный стресс + НИЭМИ. Укрупнение митохондрий. Тесные контакты митохондрий между собой и гранулярной эндоплазматической сетью (стрелки); в — НИЭМИ + иммобилизационный стресс. Явления гиперплазии рибосом и полисом, формирование гранулярной эндоплазматической сети с удлиненными цистернами (стрелки). ×18 000.

Морфометрическая характеристика митохондрий клеток Сертоли при действии НИЭМИ в условиях иммобилизационного стресса

Группа животных	Количество измерений (*n*)	Количество Мх на стандартную площадь клетки	Средняя площадь Мх, мкм^2	Суммарная площадь Мх, мкм^2
НИЭМИ + стресс (1-я)	72	6,59±0,54**	0,47±0,022**	3,09±0,22**
Контроль—стресс (2-я)	76	9,11±0,89*	0,19±0,014*	1,71±0,11*
Стресс + НИЭМИ (3-я)	82	6,45±0,42	0,41±0,029**	2,64±0,15**
Контроль—стресс (4-я)	78	7,69±0,71*	0,23±0,009*.***	1,75±0,12*
Интактная (5-я)	69	5,84±0,52	0,53±0,03	3,07±0,23

Примечание. * — $p<0,01$ по сравнению с интактной группой; ** — $p<0,01$ по сравнению с контролем; *** — $p<0,05$ между контрольными группами.

ны митохондриального компартмента, гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети и рибосом. При этом часто обнаруживались тесные контакты между Мх и гранулярной эндоплазматической сетью **(см. рис. 1, б)**, что указывало на взаимодействие этих органелл и развитие внутриклеточных интегративных процессов, нарушенных действием стресса. Характерной особенностью Мх являлось увеличение их средней площади: при первичной профилактике прирост массы Мх повышался на 147,4%, ($p<0,01$). Такое увеличение размеров Мх, несмотря на снижение числа Мх по сравнению с контролем, приводило к существенному возрастанию суммарной площади этих органелл (на 80,7%; $p<0,01$), достигая уровня интактных животных. Тот же характер сдвигов, но менее выраженный отмечался при лечебно-профилактическом использовании НИЭМИ **(см. таблицу, рис. 2)**. Наблюдаемая реорганизация митохондриального компартмента могла быть как следствием внутриорганоидной регенерации, так и результатом слияния Мх. Деструктивные процессы со стороны Мх встречались реже, чем в контроле, что, видимо, связано с антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием НИЭМИ. Выявленный механизм укрупнения Мх и достоверного увеличения их суммарной площади, отражает, по-видимому, более высокий уровень энергетического обеспечения клеток Сертоли по сравнению с контролем, что создает условия для активации пластических процессов. Это положение было подтверждено при анализе состояния белоксинтезирующих органелл. Установлено, что по сравнению с контролем увеличивалось число клеток Сертоли с высоким содержанием свободных рибосом и полисом, особенно в условиях первичной профилактики: (контроль — 5,9%, опыт — 23,5%, интактные животные — 46,7%; **см. рис. 1, в**). Возрастало также число клеток с новообразованными уд-

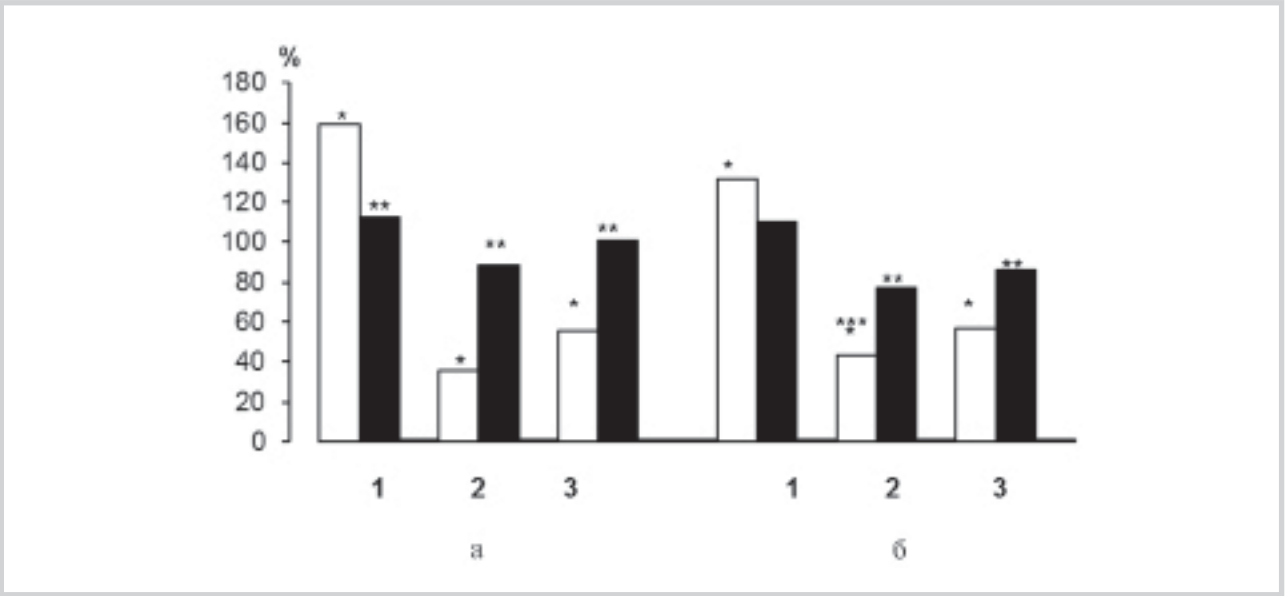

Рис. 2. **Морфометрическая характеристика митохондрий клеток Сертоли при действии НИЭМИ в условиях иммобилизационного стресса.**

А — первичная профилактика; Б — лечебно-профилактическое воздействие. 1 — количество Мх; 2 — средняя площадь Мх, мкм^2; 3 — суммарная площадь Мх, мкм^2. Светлые столбики — контроль; темные — опыт.

Примечание. * — $p<0,01$ по сравнению с интактной группой; ** — $p<0,01$ по сравнению с контролем; *** — $p<0,05$ между контрольными группами.

линенными профилями гранулярной эндоплазматической сети, что является важной регенераторной реакцией для обеспечения внутриклеточных процессов адаптации и компенсации. Этот показатель в большей степени был выражен при лечебно-профилактическом применении НИЭМИ, при котором число клеток с высоким содержанием гранулярной эндоплазматической сети достигало 45,1% (контроль 31,3%). Эти сдвиги указывали на активацию процессов регенерации со стороны белоксинтезирующих органелл. Явления гиперплазии проявлялись также в ядрах клеток Сертоли, о чем свидетельствовало увеличение их диаметра: первичная профилактика — контроль 8,42±0,19, опыт 9,05±0,18, $p=0,05$; лечебно-профилактическое воздействие — контроль 8,30±0,14, опыт 9,28±0,34, $p<0,05$; интактные животные — 8,89±0,38. Ядерная оболочка часто имела извилистую форму, что обычно наблюдается при усилении функциональной активности ядра.

Таким образом, проведенное исследование показало, что применение НИЭМИ в режимах первичной профилактики и лечебно-профилактического воздействия в условиях острого иммобилизационного стресса вызывало усиление регенеративных процессов и снижение уровня ультраструктурных нарушений в клетках Сертоли. Можно полагать, что активация процессов внутриклеточной регенерации под влиянием НИЭМИ, была, по-видимому, тесно связана с конформационными сдвигами в биомембранах разных клеток, в том числе и в клетках Сертоли, что обеспечивало развитие антиоксидантного и биостимулирующего эффектов [5]. Кроме того, весьма важную роль в активации внутриклеточных процессов регенерации играли также нейроэндокринные механизмы регуляции, в том числе система гипофиз—семенные канальцы, в которой клетки Сертоли являлись мишенью для гипофизарного фолликулостимулирующего гормона, контролирующего их функциональную деятельность [2]. Следовательно, именно взаимодействие как местных, так и общих механизмов регуляции под влиянием НИЭМИ приводит к усилению развития регенеративных процессов и ослаблению дезадаптационных постстрессорных нарушений в клетках Сертоли. Выявленные эффекты позволяют предположить перспективность дальнейшего изучения механизмов действия НИЭМИ с целью повышения устойчивости организма и его репродуктивной системы к различным экстремальным факторам.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн, написание текста, редактирование: Ю.К.

Сбор и обработка материала: М.Г., Л.Н., Л.М.

Статистическая обработка данных: М.Г., Л.Н.

ЛИТЕРАТУРА

1. Королев Ю.Н., Бобровницкий И.П., Никулина Л.А., Михайлик Л.В., Гениатулина М.С., Бобкова А.С. Применение низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях иммобилизационного стресса (экспериментальное исследование). *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2014;3:41-45.
2. Йена С.С.К., Джаффе Р.Б. *Репродуктивная эндокринология*. Пер. с англ. М.; 1998,т.1.
3. Королев Ю.Н., Курило Л.Ф., Гениатулина М.С., Никулина Л.А. Структурно-функциональные нарушения в семенниках крыс в условиях острого иммобилизационного стресса. *Андрология и генитальная хирургия*. 2012;4:25-28.
4. Королев Ю.Н., Гениатулина М.С., Никулина Л.А., Михайлик Л.В. Влияние питьевой минеральной воды и магнитного поля на развитие компенсаторно-приспособительных реакций в семенниках крыс при иммобилизационном стрессе. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2013;5:6-9.
5. Зубкова С.М. Сравнительный анализ биологического действия микроволн и лазерного излучения. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 1996;6:31-34.

Поступила 26.01.2015