

Ультраструктура клеток Лейдига при действии минеральной воды и низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях стресса у крыс

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

ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Россия

Цель — выявить особенности раздельного и сочетанного действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения (НИ ЭМИ) и минеральной воды (МВ) на ультраструктуру клеток Лейдига в условиях иммобилизационного стресса. В экспериментах на беспородных белых крысах-самцах с помощью метода электронной микроскопии было установлено, что профилактическое применение питьевой сульфатной МВ, НИ ЭМИ сверхвысокой частоты (плотность потока мощности менее 1 мкВт/см², частота около 1000 МГц) и их сочетания в условиях иммобилизационного стресса ослабляло степень развития ультраструктурных нарушений и стимулировало развитие регенеративных процессов в клетках Лейдига. Среди монофакторов наиболее выраженное усиление регенерации митохондрий происходило при действии МВ. При сочетанном применении МВ и НИ ЭМИ в большей мере, чем при монофакторах, проявлялась сохранность клеток Лейдига, что указывало на повышение их устойчивости к действию стресса.

Ключевые слова: питьевая минеральная вода, низкоинтенсивное электромагнитное излучение, сочетанное действие, иммобилизационный стресс, клетки Лейдига, внутриклеточная регенерация.

The ultrastructure of Leydig cells under the influence of drinking mineral water and electromagnetic radiation under the stress conditions in the rats

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

Federal state budgetary institution «Russian Research Centre of Medical Rehabilitation and Balneology», Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

The objective of the present study was elucidate the peculiar features of low-intensity electromagnetic radiation (LI EMR) and mineral water (MW) on the ultrastructure of rat Leydig cells under conditions of immobilization stress. The experiments were carried out on outbred male rats with the use of electron microscopy. It has been demonstrated that the prophylactic consumption of drinking sulfate-containing mineral water and the application low-intensity electromagnetic radiation (with the flow power density of 1 mcW/cm² and frequency around 1,000 Hz) or the combination of these two modalities under conditions of immobilization stress reduced the degree of ultrastructural derangement in the rat Leydig cells and stimulated the development of regenerative processes. In the cases of the single-factor impact, drinking mineral water exerted more pronounced action than low-intensity electromagnetic radiation on mitochondrial regeneration. In case of the simultaneous application of the two factors their protective action on the Leydig cells was much more conspicuous than that of either of them applied alone. It is concluded that drinking sulfate-containing mineral water in combination with the application of low-intensity electromagnetic radiation enhances resistance of the rat Leydig cells to stress.

Keywords: drinking mineral water, low-intensity electromagnetic radiation, combined action, immobilization stress, Leydig cells, intracellular regeneration.

Одним из ключевых факторов нейроэндокринной регуляции сперматогенеза является гормон тестостерон, биосинтез которого осуществляется клетками Лейдига (эндокриноцитами). Эти клетки располагаются в соединительнотканной строме семенников и осуществляют свою функцию под контролем гипоталамо-гипофизарного комплекса [1–3]. Экспериментальными исследованиями показано, что острый иммобилизационный стресс нарушает интеграционные связи, численность и ультра-

структуру клеток Лейдига [4]. Изменения касаются в основном гладкой эндоплазматической сети и митохондрий (Мх), принимающих непосредственное участие в синтезе тестостерона, а также аппарата Гольджи, который осуществляет секрецию регу-

Сведения об авторах:

Королёв Юрий Николаевич — д.м.н., проф., зав. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК, e-mail: korolev.yur@yandex.ru; Гениатулина Мариям Сабировна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК; Никулина Людмила Анатольевна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК

ляторных пептидов. Физические лечебные факторы, в том числе низкоинтенсивное электромагнитное излучение (НИ ЭМИ) и питьевая минеральная вода (МВ), предупреждают или ослабляют развитие стрессогенных нарушений за счет активации адаптационных (регенеративных) реакций, что было показано, в частности, на примере клеток Сертоли [5, 6]. Однако характер развития внутриклеточных регенеративных реакций в клетках Лейдига в условиях стресса и действия лечебных физических факторов изучен значительно слабее.

Цель исследования — выявить особенности раздельного и сочетанного действия НИ ЭМИ и МВ на ультраструктуру клеток Лейдига в условиях иммобилизационного стресса.

Эксперименты выполнены на 15 белых беспородных крысах-самцах массой 180—220 г. Работу с животными проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1968). Животные содержались в обычных условиях вивария и свободного доступа к воде и пище. Все крысы были разделены на 5 групп:

— 1-я группа (опытная) — сочетанное применение питьевой сульфатной магниевое-кальциевой МВ (концентрация сульфат-ионов 2,35 г/л, минерализация 4,3 г/л) и процедур НИ ЭМИ с последующим действием иммобилизационного стресса;

— 2-я группа (группа сравнения) — применение той же питьевой МВ с последующим действием иммобилизационного стресса;

— 3-я группа (группа сравнения) — применение процедур НИ ЭМИ с последующим действием иммобилизационного стресса;

— 4-я группа (контроль) — применение водопроводной воды и мнимых процедур НИ ЭМИ с последующим действием иммобилизационного стресса;

— 5-я группа (интактная) — животные никаким воздействием не подвергались.

МВ и водопроводную воду крысам вводили внутривентриально 1 раз в день по 3 мл через иглу с оливой на конце, всего 12 процедур. Курс воздействий НИ ЭМИ проводили при помощи аппарата Акватор-2 (ООО «Телемак», Саратов), плотность потока мощности менее 1 мкВт/см², 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. Иммобилизационный стресс осуществляли по методике Г. Селье однократным привязыванием крыс в течение 6 ч в положении на спине. Забой животных проводили через 1 день после действия стресса. Объектом исследования являлись эндокринные клетки Лейдига.

Для электронно-микроскопических исследований семенники фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере (рН

7,4), постфиксировали в 1% OsO₄. После обезвоживания образцы заключали в смесь эпон-аралдит. Исследование образцов проводили на электронном микроскопе Libra 120 (Германия) с программой Carl Zeiss STM Nano Technology system Division, которая включает в себя как режим трансмиссионного исследования, так и математическую обработку внутриклеточных структур. Проводили морфометрический анализ Мх в клетках Лейдига (количество, средняя и суммарная площади), а также подсчитывали число этих клеток с различным типом эндоплазматической сети. Кроме того, проводили морфометрический анализ секреторного аппарата Гольджи (число органелл и количество его секреторных везикул). Для статистической обработки полученных данных использовали критерий Стьюдента.

При электронно-микроскопическом исследовании интактных крыс мы разделяли клетки Лейдига на 2 группы [7]: тубулярного (85,7%) и везикулярного (12,3%) типов эндоплазматической сети. В клетках тубулярного типа определялось большое число мелких трубочек и везикул гладкой эндоплазматической сети, плотно прилежащих друг к другу, а также большое количество Мх, которые часто имели трубчатые кристы и электронно-плотный матрикс. Иногда наблюдались липидные включения разных размеров. Для клеток Лейдига везикулярного типа характерными являлись расширенные просветы везикул гладкой эндоплазматической сети, в связи с чем их цитоплазма становилась более светлой, а единичные клетки местами приобретали «пенистый» вид. Мх становились более крупными, их матрикс просветлялся.

В контрольной группе при действии иммобилизационного стресса отмечалось увеличение числа клеток Лейдига в 6 раз по сравнению с интактными животными с выраженными деструктивными (дегенеративными) процессами. При этом уменьшалось число клеток с нормальной структурой как тубулярного, так и везикулярного типов (см. таблицу). Мх становились мелкими и, несмотря на увеличение числа, их суммарная площадь снижалась. Особенно четко эти сдвиги проявлялись в клетках везикулярного типа: средняя площадь Мх уменьшалась в 6 раз ($p < 0,01$), а суммарная площадь — более чем в 3 раза ($p < 0,01$). Обнаруживались также явления деструкции мембран Мх и других органелл, в том числе секреторного аппарата Гольджи, численность которого проявляла тенденцию к снижению. Следовательно, действие иммобилизационного стресса вызывало существенные нарушения в структурно-функциональном состоянии клеток Лейдига.

Предварительное применение МВ и НИ ЭМИ усиливало адаптационную направленность сдвигов в клетках Лейдига в условиях стресса по сравнению с контролем. Среди монофакторов наибольший эф-

Морфометрический анализ клеток Лейдига при действии МВ и НИ ЭМИ в условиях иммобилизационного стресса

Группа животных	Соотношение клеток Лейдига с разным типом эндоплазматического ретикулума, %		Число дегенеративных клеток, %	Мх в клетках тубулярного типа			Мх в клетках везикулярного типа		
	тубулярный тип	везикулярный тип		количество на стандартную площадь, мкм ²	средняя площадь, мкм ²	суммарная площадь, мкм ²	количество на стандартную площадь клетки, n	средняя площадь, мкм ²	суммарная площадь, мкм ²
Интактная	85,7	12,3	2,0	5,61±0,27	0,24±0,007	1,33±0,15	4,33±1,02	0,86±0,26	3,72±0,97
Контроль (стресс)	79,2	8,3	12,5	8,14±0,60 ⁺⁺	0,15±0,007*	1,20±0,13	7,40±1,07 ⁺	0,13±0,015 ⁺⁺	0,95±0,10 ⁺⁺
МВ	73,6	18,9	7,6	5,88±0,40**	0,23±0,008**	1,34±0,14	3,40±0,32**	0,45±0,045**	1,52±0,13**
НИ ЭМИ	73,3	17,3	9,3	5,44±0,43**	0,21±0,006**	1,14±0,11	3,44±0,27**	0,38±0,019**	1,30±0,11*
МВ + НИ ЭМИ	80,5	14,9	4,6	8,24±0,52	0,16±0,003	1,31±0,14	4,64±0,69*	0,28±0,026**	1,29±0,11*

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

фект был выявлен при действии МВ (см. таблицу). Это проявлялось в повышении числа клеток с нормальной структурой и в снижении числа деструктивно измененных клеток. Ультраструктурный анализ показал более высокий уровень биоэнергетического обеспечения клеток Лейдига, особенно везикулярного типа, что проявлялось в увеличении суммарной площади Мх ($p < 0,01$). Это происходило за счет отчетливого повышения средней площади Мх более чем в 3 раза ($p < 0,01$) на фоне снижения числа органелл. Следовательно, регенерация Мх под влиянием МВ осуществлялась в основном в виде внутриорганойдной ее формы. При действии НИ ЭМИ определялся тот же характер сдвигов, что и при действии МВ, но в более слабой степени. В частности, отмечалась тенденция к снижению суммарной площади Мх в клетках тубулярного типа, которая становилась наиболее низкой среди всех исследованных групп. Таким образом, при раздельном применении МВ и НИ ЭМИ в условиях стресса более высокий биоэнергетический потенциал в клетках Лейдига был выявлен при действии МВ.

При сочетанном использовании МВ и НИ ЭМИ характерным являлось более выраженное снижение числа дегенеративно измененных клеток по сравнению с контролем и действием монофакторов (см. таблицу). При этом количественное соотношение обоих типов клеток Лейдига в наибольшей мере приближалось к уровню интактных животных. Суммарная площадь Мх возростала по сравнению с контролем, но не достигала эффекта действия МВ. Следует также отметить, что в отличие от монофакторов суммарная площадь Мх повышалась в основном за счет увеличения их числа и в меньшей степени размеров. Это указывает на усиление органоидной формы регенерации Мх по сравнению с внутриорганойдной, более характерной для действия монофакторов. Кроме того, особенностью сочетанного действия МВ и НИ ЭМИ являлась также тенденция к увеличению численности секреторного аппарата Гольджи: $0,88 \pm 0,09$ против $0,63 \pm 0,08$ в контроле, при этом количество везикул достоверно возростало по сравнению с контролем ($p < 0,01$), что указывало на усиление его функциональной активности.

Таким образом, действие иммобилизационного стресса приводило к увеличению числа деструктивно измененных клеток Лейдига, уменьшению их общей численности, развитию ультраструктурных нарушений с угнетением биоэнергетических и биосинтетических процессов. Профилактическое использование монофакторов МВ, НИ ЭМИ и их сочетанное воздействие ослабляло степень постстрессорных нарушений и стимулировало развитие клеточной и внутриклеточной регенерации. Из монофакторов более эффективным в этом плане оказалось действие МВ, особенно по показателям структурного обеспечения биоэнергетики. Однако

сочетанное применение МВ и НИ ЭМИ в большей степени предотвращало развитие дегенеративно измененных и повышало общую численность нормальных клеток, а также улучшало соотношение (баланс) между двумя типами клеток Лейдига, приближая его к уровню интактных животных. Эти сдвиги наряду с гиперплазией мембранных структур секреторного аппарата Гольджи, везикул, Мх, канальцев гладкой эндоплазматической сети свидетельствовали об усилении адаптационно-защитных реакций в клетках Лейдига и являлись структурной основой для повышения их функциональной активности.

В целом на основании полученных данных можно полагать, что сочетанное применение МВ и НИ ЭМИ в большей мере, чем монофакторы, повышают резервные возможности и устойчивость клеток Лейдига к действию иммобилизационного стресса.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования, редактирование: Ю.К.

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

Статистическая обработка данных: М.Г.

Написание текста: Ю.К., М.Г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Йена С.С.К., Джаффе Р.Б. *Репродуктивная эндокринология*. Т. 1. Пер. с англ. М.; 1998.
2. Krestler DM, Kerr JB. The Cytology of the Testis. In: Knobil E, Neill J, eds. *The physiology of reproduction*. N.Y.: Raven Press; 1988:837-932.
3. Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev*. 1994;15(5):574-626.
4. 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):47-52.
5. Королев Ю.Н., Гениатулина М.С., Никулина Л.А. Ультраструктурные изменения клеток Сертоли семенников крыс при применении питьевой минеральной воды в сочетании с микроэлементами цинком и кремнием в условиях стресса. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2012;(5):49-53.
6. Королев Ю.Н., Гениатулина М.С., Никулина Л.А., Михайлик Л.В. Ультраструктурные проявления регенеративных процессов в клетках Сертоли при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях стресса у крыс. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2015;(3):40-44.
7. Шевлюк Н.Н., Блинова Е.В., Боков Д.А., Елина Е.Е., Мешкова О.А. Интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига) семенников в постнатальном онтогенезе млекопитающих. *Вопросы морфологии XXI века*. 2009;136(4):192-195.

Поступила 23.10.2015