

УДК 612.4.09

## АПОПТОЗ В ГЕРМИНАТИВНОЙ ТКАНИ СЕМЕННИКОВ ПРИ НАРУШЕНИИ НЕРВНОЙ И ЭПИФИЗАРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Е.В. Слесарева, С.М. Слесарев

*Ульяновский государственный университет*

У самцов белых крыс с эпифизарной недостаточностью и нарушением периферической иннервации семенников выявлялась экспрессия ферментов, участвующих в апоптозе и репарации ДНК в сперматогенных клетках, – прокаспазы-3 и PARP-1 (p116/25). Определение ферментов осуществлялось в темное (1 ч) и светлое (13 ч) время на протяжении двух суток. Эпифизарная недостаточность привела к значительному росту экспрессии изучаемых ферментов в созревающих половых клетках и исчезновению циркадианного ритма их динамики. Периферическая денервация семенников, не приводя к исчезновению суточной ритмичности экспрессии ферментов, вызвала значительный рост уровня прокаспазы-3 и PARP-1. Выявленные факты свидетельствуют о росте повреждений в структуре ДНК сперматогенных клеток при нарушении некоторых звеньев внегипоталамической регуляции.

**Ключевые слова:** сперматогенез, суточный ритм, апоптоз, эпифизэктомия, денервация семенников, прокаспазы-3, PARP-1.

**Введение.** Проблемы охраны репродуктивного здоровья являются приоритетными в отечественной медицине и здравоохранении. Система оказания помощи мужчинам с патологией репродуктивной системы в настоящее время находится в стадии своего становления, что диктует актуальность и востребованность фундаментальных исследований, посвященных этому вопросу. Инфекционно-воспалительные процессы, нарушения эндокринной и нервной регуляции функционирования гонад – одни из основных причин мужского бесплодия. Данные факторы могут оказывать повреждающее действие как на органно-тканевом уровне, так и на уровне генома половых клеток.

С развитием представлений об апоптозе как общебиологическом явлении возникает вопрос о его роли в формировании половых клеток и возможных нарушениях течения при нейро-эндокринной патологии. Известно, что нарушение синтеза и секреции фолликулостимулирующего гормона гипофиза и тестостерона приводит к гибели значительной части сперматогоний и сперматоцитов [3, 8]. В то же время и в нормальных условиях процесс пролиферации и дифференцировки по-

ловых клеток сопровождается удалением части клеток на каждой стадии созревания сперматозоидов [6]. Нарушения внегипоталамической регуляции данных процессов остаются на настоящем этапе малоизученными.

**Цель исследования.** Изучение уровня активности ферментов – индукторов апоптоза в герминативной ткани семенников при нарушении эпифизарной и периферической нервной регуляции.

**Материалы и методы.** Опыт выполнен на 72 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 активности ферментов – индукторов апоптоза в сперматогенных клетках по истечении адаптационного периода крысы были разделены на три экспериментальные группы: интактные контрольные (n=24); эпифизэктомизированные (n=24) и животные после денервации правого семенника. Эпифизэктомия проводилась по оригинальной методике [2]. Все эксперименты, уход и содержание животных осуществлялись в соответствии с Дерективой № 63 от

22.09.2010 г. Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава России № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Выживаемость животных после операции эпифизиотомии составила 69 %. Денервацию проводили по методике, предложенной В.В. Невструевой [4], без экстирпации ганглиев чревного сплетения, что позволило сохранить нормальную иннервацию тканей мошонки. Прооперированных животных продолжали содержать при режиме освещенности/темнота, равном 12/12 (освещение с 6 до 18 ч). Животных с неудовлетворительным состоянием, выражающимся в нарушении координации движений, уменьшении веса, нарушениях функций кишечника, появлении воспалительных процессов, в эксперименте в дальнейшем не использовали.

Выведение животных из эксперимента производили под эфирным наркозом на 40–41-й дни после оперативных вмешательств в 1 ч (темное время) и 13 ч (светлое время) в течение двух суток, что обеспечивало исследование активности ферментов на протяжении двух периодов суточного ритма.

Семенники фиксировали в забуференном формалине и по стандартной гистологической методике изготавливали парафиновые поперечные срезы толщиной 5 мкм. Об уровне апоптоза созревающих половых клеток судили по активности ферментов, участвующих в индукции апоптоза (прокаспазы-3) и в посттрансляционной репарации ДНК (полиаденозин-рибозо-полимераза – PARP-1). Белки-ферменты выявлялись иммуногистохимически на парафиновых срезах в патологоанатомической лаборатории Республиканской клинической больницы г. Казани. Оценку активности ферментов проводили в сперматоцитах на стадии метафазы мейоза и сперматидеях 7–8 этапов развития, используя показатель оптической плотности окрашивания ядер (программа денситофотометрии Mecos C-1).

Для микроскопирования применяли микроскоп Axiostar Plus (Carl Zeiss) с увеличением в 1000 раз (окуляр  $\times 10$ , объектив  $\times 100$ ). Измерения производились с помощью меди-

цинской компьютерной видеосистемы, состоящей из микроскопа Axiostar Plus (Carl Zeiss), цифровой фотокамеры Nikon COOLPIX 995, персонального компьютера Pentium IV и программы автоматизированной обработки изображений Mecos C-1. Для всех параметров при статистической обработке вариационных рядов вычислялись значения средней арифметической взвешенной ( $M$ ), ошибки средней арифметической взвешенной ( $m$ ). Достоверность различий между показателями оценивалась  $t$ -критерием Фишера–Стьюдента. Уровень значимости различий был принят  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В группе интактных животных было установлено повышение уровня экспрессии прокаспазы-3 как в сперматоцитах, так и в сперматидеях в темновую фазу фотопериода (табл. 1). Известно, что при стимуляции ткани каким-либо митогеном ее клетки переходят в состояние повышенной митотической активности, которое сопровождается активацией апоптоза. При сперматогенезе повышение уровня пролиферативных процессов в темновую фазу эксперимента приводит к тому, что уровень содержания ферментов-индукторов апоптоза также повышается в темновую фазу цикла [1]. Помимо концентрации прокаспазы-3 в сперматогенных клетках нами определялась удельная оптическая плотность иммуногистохимического комплекса PARP-1 – первичные АТ (PARP-1) – DAB-chromogen (табл. 1).

Независимо от пути, по которому протекает апоптоз, его конечным итогом является разрушение ДНК с последующей активацией PARP-1 [7]. В целом, у интактных животных динамика активности PARP-1 соответствовала изменениям уровня каспазы-3 в сперматоцитах и сперматидеях при спермиации и на этапе мейоза (табл. 1). Также определялись достоверные различия экспрессии данного фермента в темновую и световую фазы в течение двух суток эксперимента, что свидетельствует о циркадианном ритме его активности. Повышение уровня PARP-1, как и рост пролиферативной активности сперматогоний и сперматоцитов, наблюдалось в темное время эксперимента.

Таблица 1

**Суточная динамика оптической плотности комплексов белок–АТ  
в сперматогенных клетках интактных белых крыс ( $M \pm m$ ), опт. ед.**

Этап развития половых клеток	Прокаспаза-3		PARP-1	
	Светлое время	Темное время	Светлое время	Темное время
Ядра сперматид 7–8 этапов развития	0,257±0,031*	0,417±0,037*	0,399±0,025*	0,567±0,018*
Цитоплазма сперматоцитов на этапе мейоза	0,103±0,022*	0,290±0,026*	0,172±0,036*	0,398±0,029*

**Примечание.** \* –  $p < 0,001$  при сравнении значений, полученных в светлое и темное время.

Таким образом, у интактных животных наблюдался циркадианный ритм физиологической дегенерации части созревающих половых клеток. Выявленный ритм обнаруживал зависимость от свето-темнового цикла.

Несмотря на повышенную митотическую активность сперматогоний, масса семенников после эпифизэктомии не изменилась. По свидетельству Рузен-Ранге, количество возможно-образовавшихся сперматозоидов из одной стволовой сперматогонии для данного вида животных всегда постоянно и не зависит от каких-либо регуляторных влияний [5]. Число образующихся сперматозоидов определяется количеством делений стволовой сперматогонии в процессе дифференцировки. Однако оно всегда ниже, чем можно предположить путем простого умножения. Данное снижение обеспечивается процессами физиологической дегенерации, которым подвергается часть дифференцирующихся половых клеток, благодаря чему в организме достигается биологическое равновесие между процессами пролиферации сперматогоний и выхода зрелых

сперматозоидов. Вероятно, после эпифизэктомии происходит как увеличение пролиферативной активности сперматогоний, так и повышение процента дегенерирующих клеток, что в целом не отражается на массе органа у полиэстричных животных.

С целью подтверждения данного предположения нами исследовался уровень содержания некоторых ферментов (прокаспаза-3, PARP-1) в извитых семенных канальцах, участвующих в процессах апоптоза созревающих половых клеток, у эпифизэктомированных крыс. После удаления эпифиза произошло достоверное повышение уровня данных ферментов с утратой различий экспрессии в темное и светлое время суток (табл. 2).

Данный факт свидетельствует о том, что с ростом пролиферативной активности сперматогоний после эпифизэктомии увеличивается и количество «поломок» в структуре ДНК, а соответственно, и большее количество созревающих половых клеток удаляется из дальнейшей дифференцировки.

Таблица 2

**Суточная динамика оптической плотности комплексов белок–АТ  
в сперматогенных клетках эпифизэктомированных белых крыс ( $M \pm m$ ), опт. ед.**

Этап развития сперматогенных клеток	PARP-1		Прокаспаза-3	
	Светлое время	Темное время	Светлое время	Темное время
Ядра сперматид 7–8 этапов развития	0,615±0,027	0,603±0,018	0,428±0,052	0,467±0,071
Цитоплазма сперматоцитов на этапе мейоза	0,384±0,042	0,440±0,056	0,183±0,031	0,243±0,058

Эти положения согласуются с общепринятым понятием об апоптозе как фундаментальном биологическом процессе, занимающем ведущее место в поддержании гомеостаза и сохранении клеточного баланса в многоклеточном организме. Хорошо известны свойства одного из гормонов эпифиза – мелатонина как протектора ДНК и сильного антиоксиданта [9]. Вероятно, при отсутствии биоактивных веществ эпифиза и при повышении пролиферативной активности сперматогоний уровень нарушений в структуре ДНК созревающих половых клеток значительно увеличивается, что приводит к активации белков-ферментов, запускающих программу апоптоза.

Изучая уровень активности ферментов – индукторов апоптоза в денервированных семенниках (прокаспаза-3, PARP-1), выявили значительное увеличение уровня их экспрес-

сии в данной экспериментальной группе при сохранении тенденции циркадианного ритма экспрессии изучаемых ферментов (табл. 3). Рост экспрессии прокаспазы-3 и PARP-1 после денервации семенника по сравнению с интактными животными составил 1,8–2,0 раза. Сохранялась тенденция различия между дневным и ночным уровнем синтеза как PARP-1 (p116/25), так и прокаспазы-3, т.е. при денервации циркадианный ритм продукции данных белков сохранялся. Таким образом, денервация приводит к росту поврежденных ДНК, с чем связано и увеличение активности PARP-1 в сперматоцитах и сперматиде, а также активация каспазозависимого пути апоптоза. Наличие циркадианного ритма пролиферации сперматогоний в денервированных семенниках позволяет сохранить и суточный ритм экспрессии ферментов – индукторов апоптоза.

Таблица 3

**Суточная динамика оптической плотности комплексов белок–АТ в сперматогенных клетках денервированных семенников белых крыс ( $M \pm m$ ), опт. ед.**

Этап развития сперматогенных клеток	PARP-1		Прокаспаза-3	
	Светлое время	Темное время	Светлое время	Темное время
Ядра сперматид 7–8 этапов развития	0,732±0,056	0,886±0,041	0,521±0,05	0,673±0,057
Цитоплазма сперматоцитов на этапе мейоза	0,456±0,038	0,553±0,034	0,304±0,026*	0,412±0,021*

**Примечание.** \* – различия достоверны при сравнении значений в темное и светлое время суток ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Таким образом, нарушение некоторых звеньев нейро-эндокринной регуляции процесса созревания мужских половых клеток, а в частности эпифизарная недостаточность и нарушение периферической иннервации, приводит к значительному росту «поломок» в структуре ДНК сперматоцитов и сперматид и активации каспазозависимого пути апоптоза сперматогенных клеток. Эти процессы несомненно сказываются на фертильности организма и снижают его адаптивные возможности.

1. Арав В. И. Влияние пептидов эпифиза на суточную динамику пролиферации сперматогоний белых крыс / В. И. Арав, В. Ф. Сыч, Е. В. Сле-

сарева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 6. – С. 678–682.

2. Арав В. И. Метод экстирпации эпифиза у белых крыс / В. И. Арав, С. М. Слесарев, Е. В. Слесарева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – № 9. – С. 385–387.

3. Бабичев В. Н. Нейроэндокринология репродуктивной системы (состояние физиологических исследований и перспективы их применения в клинической практике) / В. Н. Бабичев // Проблемы эндокринологии. – 1998. – Т. 44, № 1. – С. 3–12.

4. Невструева В. В. Субмикроскопическая организация клеток Лейдига в норме и при нарушении механизмов иннервации / В. В. Невструева // Тр. 2-го Моск. мед. ин-та. Сер. Эмбриология и гистология. Вып. 3. – М., 1974. – Т. 15. – С. 161–169.

5. Рузен-Ранге Э. Сперматогенез у животных / Э. Рузен-Ранге. – М.: Мир, 1980. – 165 с.

6. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis / E. B. Rucker [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 14, № 7. – P. 1038–1052.

7. Dieldrin promotes proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase and apoptosis in dopaminergic cells: protective effect of mitochondrial anti-apoptotic protein Bcl-2 / M. Kitazawa [et al.] // *Neurotoxicology.* – 2004. – Vol. 25, № 4. – P. 589–598.

8. *Meachem S.* Spermatogonia: stem cells with a great perspective / S. Meachem, V. von Schonfeldt, S. Slatt // *Reprod.* – 2001. – Vol. 121, № 6. – P. 825–834.

9. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis / M. J. Jou [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 389–403.

## APOPTOSIS OF TESTICULAR GERMINAL TISSUE IN CONDITION DISORDERS OF THE NERVOUS AND EPIPHYSEAL REGULATIONS

E.V. Slesareva, S.M. Slesarev

*Ulyanovsk State University*

Expression of enzymes involved in apoptosis and DNA repair in spermatogenic cells – procaspase-3 and PARP-1 (p116/25), was detected in male of white rats with epiphyseal deficiency and impaired peripheral innervation of the testes. Determination of enzyme was carried out in the dark (1 hr) and light (13 h) time for two days. Epiphyseal deficiency caused a significant increase in the expression of the researched enzymes in maturing germ cells and the disappearance of their circadian rhythm. Peripheral denervation of the testes, without leading to the disappearance of the daily rhythm of enzymes expression caused a significant increase the level of procaspase-3 and PARP-1. These findings indicate the increase a damage in the DNA structure of the spermatogenic cells at interruption of some steps of outside the hypothalamic regulation.

**Keywords:** spermatogenesis, circadian rhythm, apoptosis, epiphysectomy, denervation of the testes, procaspase-3, PARP-1.