

УДК 57.017.53+57.033

ИЗМЕНЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ ФУНКЦИЙ САМЦОВ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА

© 2019 г. С. Г. Пивина¹, Г. И. Холова¹, В. В. Ракицкая¹, В. К. Акулова¹, Н. Э. Ордян^{1,*}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, Россия

*e-mail: neo@infran.ru

Поступила в редакцию 22.01.2019 г.

После доработки 04.03.2019 г.

Принята к публикации 26.04.2019 г.

DOI: 10.1134/S0044452919050115

В условиях падения рождаемости проблема охраны репродуктивного здоровья приобретает особую медицинскую и социальную значимость. Уровень заболеваемости мужчин в отношении репродуктивной патологии неуклонно возрастает. Связано это не только со снижением физической активности и неправильным питанием, но и с широким распространением различных психических заболеваний, опосредованных действием тяжелых стрессорных факторов [1]. К таким заболеваниям относится посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), при котором в клинических исследованиях у пациентов обнаружены сексуальные дисфункции [2]. Длительное течение этого заболевания, сопряженное со значительными перестройками нейроэндокринных функций, может являться причиной снижения фертильности, нарушения сперматогенной функции семенников и впоследствии иметь негативное влияние на потомство.

В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение репродуктивных функций, в том числе показателей сперматогенеза самцов крыс, находящихся в ПТСР-подобном состоянии, которое моделировали в парадигме “стресс-рестресс”.

Опыты выполнены на половозрелых самцах крыс линии Вистар из ЦКП “Биоколлекция” ИФ РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище. Все исследования проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (86/609/ЕЕС), используемых для экспериментальных исследований.

ПТСР-подобное состояние создавали, подвергая самцов травматическому стрессорному воздействию, состоящему из последовательно применяемых стрессоров: двухчасовая иммобилизация, 20-мин плавание и эфирный стресс до потери со-

знания с последующим “рестрессом” (30-мин иммобилизация) на 7 сут после травматического стресса, как описано ранее [3]. Контрольных животных оставляли интактными. На 10 сут после “рестресса” (17 сут после травматического стресса) подопытных и контрольных самцов декапитировали, извлекали семенники и надпочечники, которые взвешивали. Семенники фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем проводили стандартную гистологическую обработку ткани, которая заключалась в проводке материала через этиловые спирты возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%, 96% по 1 ч) и через бутанола (1 ч и ночь). Затем материал проводили через 4 порции ксилола (по 15 мин) и заливали в парафиновые блоки. Далее при помощи микротомы изготавливали серии чередующихся срезов семенных желез во фронтальной плоскости толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином. Морфологические исследования проводили с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval (CarlZeiss, Germany), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronik, Germany) и компьютера IBM PC с программным обеспечением “Videotest Master Morphology” (Россия) при общем увеличении $\times 4$, $\times 20$, $\times 40$. Морфологические особенности строения семенных желез исследовали по следующим параметрам: количество извитых семенных канальцев в одном поле зрения и площадь поперечного сечения извитого семенного канальца; толщина сперматогенного эпителия извитого семенного канальца; количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца и их площадь; количество разных видов сперматогенных клеток (сперматогоний различной степени зрелости, сперматоцитов и сперматид) в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца, а также количество сперматозоидов

Таблица 1. Показатели состояния самцов крыс при моделировании посттравматического стрессового расстройства

Показатель	Контроль- ные самцы (<i>n</i> = 5)	Самцы с моделированием ПТСР (<i>n</i> = 5)
Вес животных (г)	297.5 ± 3.8	279.3 ± 4.7*
Вес надпочечников (г)	33.6 ± 1.8	24.4 ± 1.0*
Вес семенников (г)	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.4
Содержание кортикостерона в плазме крови (нмоль/л)	245 ± 16	126.0 ± 13.5*
Содержание тестостерона в плазме крови (нмоль/л)	14.2 ± 2.7	7.7 ± 1.2*
Морфометрические показатели извитых семенных канальцев		
Количество извитых семенных канальцев	53.6 ± 1.9	56 ± 1.4
Площадь поперечного сечения извитого семенного канальца, мкм ²	68165 ± 3630	66348 ± 2040
Толщина сперматогенного эпителия извитого семенного канальца, мкм	68.4 ± 2.4	72.3 ± 2.5
Количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца	32.8 ± 1.4	35.2 ± 1.9
Площадь клеток Сертоли, мкм ²	93.1 ± 5.6	81.2 ± 4.3*
Количество недифференцированных сперматогониев в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца	58 ± 2.9	51.4 ± 2.7*
Количество дифференцирующихся сперматогониев в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца	49.8 ± 0.9	46.6 ± 1.2*
Количество сперматоцитов в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца	42.7 ± 1.3	36.7 ± 1.7*
Количество сперматид в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца	41.4 ± 2.8	43.6 ± 2.4
Количество сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца	312.8 ± 24.6	303.3 ± 28.3

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0.05$) между контрольными и подопытными группами крыс.

в просвете извитого семенного канальца. Измерения проводили в 75 поперечных срезах извитых семенных канальцев и окружающих их участках интерстициальной ткани.

Туловищную кровь, полученную при декапитации, центрифугировали при 2500 об/мин и 40°C, полученную плазму сохраняли при –200°C до момента определения содержания кортикостерона и тестостерона. Оценку уровня гормонов в плазме крови проводили с использованием стандартных наборов для иммуноферментного анализа (“Хема-Медика”, Россия), согласно рекомендации производителя.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (Dunnnett’s test) отдельных групп. В качестве критерия достоверности принимали $p < 0.05$. Результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка.

Проведенные исследования показали, что на 10 сут формирования ПТСР-подобного состояния наблюдается снижение веса подопытных самцов, а также уменьшение содержания в плазме кортикостерона и тестостерона по сравнению с контрольными животными (табл. 1). При этом вес семенников у контрольных и подопытных самцов не разли-

чался. Следует отметить, что сниженный уровень глюкокортикоидов в крови характерен для клинической картины ПТСР [4], тогда как снижение уровня тестостерона является, вероятно, следствием сильного стрессорного воздействия (травматический стресс).

Морфометрический анализ семенников выявил нарушение сперматогенеза на его ранних стадиях у самцов при формировании ПТСР-подобного состояния. Обнаружено снижение количества недифференцированных сперматогониев, дифференцирующихся сперматогониев и сперматоцитов в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца, тогда как количество сперматид в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца и количество сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца не изменялись. Кроме того, выявлено изменение площади клеток Сертоли, которая статистически значимо снижалась у подопытных самцов, что, вероятно, обусловлено значительным снижением уровня тестостерона в крови этих животных. Несмотря на то что после травматического стресса и последующего релакса основные изменения закономерно обнаружены на ранних стадиях сперматогенеза, учитывая общую длительность этого процесса и его отдельных стадий у крыс [5], в более отдаленный период времени, вероятнее всего, будут наблюдаться нарушения

и поздних стадий сперматогенеза, что может негативно отразиться на способности этих животных к размножению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-015-00186 (руководитель проекта Н.Э. Ордян).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Day J., Savani S., Krempley B.D., Nguyen M., Kitlinska J.B. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. *Am. J. Stem Cells*. 5 (1): 11–18. 2016.
2. Yehuda R., Lehrner A., Rosenbaum T.Y. PTSD and sexual dysfunction in men and women. *J. Sex Med.* 12 (5): 1107–1119. 2015.
3. Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Смоленский И.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Модификация экспрессии нейроромонов в гипоталамусе пренатально стрессированных самцов крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 50 (4): 305–311. 2014. [Pivina S.G., Rakitskaya V.V., Smolenskii I.V., Akulova V.K., Ordyan N.E. Modification of expression of neurohormones in hypothalamus of prenatally stressed male rats in model of posttraumatic stress disorder. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 50 (4): 305–311. 2014 (in Russ)].
4. Yehuda R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. *Ann. NY Acad. Sci.* 1179: 56–59. 2009.
5. Hess R.A., Chen P. Computer tracking of germ cells in the cycle of the seminiferous epithelium and prediction of changes in cycle duration in animals commonly used in reproductive biology and toxicology. *J. Andrology*. 13 (3): 185–190. 1992.

Changes in the Reproductive Function of Male Rats in a Posttraumatic Stress Disorder Model

S. G. Pivina^a, G. I. Kholova^a, V. V. Rakitskaya^a, V. K. Akulova^a, and N. E. Ordyan^{a,#}

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: neo@infran.ru