

УДК 577.125:591.463.2:599.323.4]:591.436.2:597

В.М. Черток, Т.А. Ботвич, М.А. Хасина, О.А. Артюкова

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЖИРА ПЕЧЕНИ МИНТАЯ

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: семенник, липидный обмен, жир печени минтая.

Жир печени минтая (ЖПМ), содержащий высокие концентрации полиненасыщенных жирных кислот и витамина А, получил широкое применение в лечебной практике [1, 5, 11]. Однако длительное использование ЖПМ, являющееся необходимым условием для повышения эффективности лечения хронических заболеваний, приводит к структурно-функциональным изменениям в семенниках, вызывая серьезные нарушения репродуктивной функции [1, 6, 7]. Не исключено, что отмеченные отклонения обусловлены прежде всего нарушениями липидного обмена, которые связаны с избыточным поступлением в организм жиров [3, 8, 9, 10, 13]. Целью настоящей работы явился анализ структуры и показателей липидного обмена семенников при длительном употреблении ЖПМ.

Работа выполнена на половозрелых белых крысах массой 200 г. Животные были разделены на три группы (по 15 крыс в каждой). Крысы первой группы (контроль 1) получали нормативную пищевую смесь, другой (контроль 2) – пищевую смесь с подсолнечным маслом из расчета 0,1 г/кг массы тела. Подопытным животным в пищу добавляли ЖПМ также из расчета 0,1 г/кг массы тела. Рыбий жир содержал 45% полиненасыщенных жирных кислот (в том числе 21% эйкозопентаеновой и 22% докозгексаеновой) и 250 ЕД витамина А. Контроль качества жира проводили по кислотному, перекисному и йодному числам. Остаточное количество пестицидов не превышало максимально допустимых уровней, а содержание токсических элементов – норм, утвержденных МЗ РФ. Крыс декапитировали через 1, 3, 6 и 12 месяцев после начала эксперимента.

Идентификацию липидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках 6×6 см с силикогелем КСК и размером частиц 57 мкм. Фосфолипиды (ФЛ) количественно определяли универсальным молибдатным реагентом после сжигания в присутствии 72% хлорной кислоты. Суммарный холестерин (ХЛ) в липидных экстрактах находили с использованием окрашивающего реагента (раствор хлорного железа в ортофосфорной кислоте) и последующей колориметрии при дли-

не волны 550 нм. Концентрацию ХЛ определяли по калибровочной кривой, построенной по алиquotным частям стандартного раствора ХЛ [3].

Для гистологического исследования семенники фиксировали в жидкости Штieve и 10%-ном формалине, заливали в парафин. Срезы толщиной до 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также сульфатом нильского голубого для определения локализации ФЛ и суданом черным В для выявления общих липидов (ОЛ). На срезах подсчитывали среднюю площадь семенных канальцев, количество измененных извитых канальцев, индекс сперматогенеза, число сперматогониев и сперматцитов [4]. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

Структура семенников у крыс, получавших в течение месяца ЖПМ или подсолнечное масло, соответствовала таковой у интактных животных (контроль 1). Дольки семенника на срезах заполнены семенными канальцами, плотно прилегающими друг к другу. В них определялись сперматогенные клетки, находившиеся на разных стадиях развития (рис. 1, а).

Концентрация ХС и ФЛ в экстракте из ткани семенников зависела от длительности применения диеты, содержащей жиры (табл. 1). Вместе с тем отмеченные изменения выражены в большей степени при использовании в качестве пищевой добавки ЖПМ.

Употребление животными в течение месяца подсолнечного масла (контроль 2) не приводило к достоверным изменениям показателей липидного обмена. Более существенные сдвиги отмечены при скормлении животным рыбьего жира: по сравнению с 1-й контрольной группой уровень ХС в ткани семенников снижался на 19,8%, а уровень ФЛ возрастал на 16,1% ($p < 0,05$). Различия этих показателей по сравнению с контролем 2 были не столь выражены и лишь в отношении ХС достигали достоверного уровня. Характерны изменения индекса ХС/ФЛ: нерезкое уменьшение при употреблении подсолнечного масла и сокращение более чем на треть при воздействии ЖПМ.

При гистохимических исследованиях препаратов семенников животных, получавших в течение месяца

Таблица 1

Показатели липидного обмена в семенниках крыс в зависимости от длительности употребления подсолнечного масла и ЖПМ

Группа	Длительность эксперимента	Показатели липидного обмена		
		ХС, мг/кг	ФЛ, мг/кг	ХС/ФЛ
Контроль 1	—	208±10	827±21	0,25
Контроль 2	1 мес.	191±8	855±26	0,22
	3 мес.	182±12	860±29	0,21
	6 мес.	221±10	798±19	0,28
	12 мес.	249±16	714±42	0,35
Опыт	1 мес.	166±14	959±56	0,18
	3 мес.	178±16	896±55	0,19
	6 мес.	279±13	674±42	0,41
	12 мес.	348±18	581±34	0,60

подсолнечное масло или рыбий жир, заметных отклонений в распределении ФЛ и ОЛ не установлено. У них, как и у интактных крыс, в цитоплазме сперматогенного эпителия и сустентоцитов определялись светлые глыбки фосфолипидных включений. Они располагались преимущественно в околоядерной зоне и по периферии клеток в виде достаточно плотных ободков. В ядрах клеток были видны мелкие пылевидные частицы ФЛ. Более интенсивную реакцию обнаруживали дифференцированные клетки, лежащие ближе к просвету канальца: сперматиды и сперматоциты. В интерстициальной ткани мелкие глыбки преципитата локализовались в цитоплазме гландулоцитов. Гранулы ОЛ обычно не формировали компактных скоплений в цитоплазме клеток извитых канальцев, а располагались относительно равномерно. В гландулоцитах липидные гранулы были крупнее и группировались, как правило, около ядра или реже – на периферии клеток. Указанные особенности распределения маркеров ФЛ и ОЛ регистрировались в клетках подавляющего большинства извитых канальцев и в интерстициальной ткани семенника. Однако в 1'3% канальцев и 4'5% гландулоцитов отмечалось повышение или понижение интенсивности реакции на ФЛ или ОЛ, что, скорее всего, связано с функциональными особенностями сперматогенеза [4, 8, 9].

Увеличение продолжительности употребления подсолнечного масла до 3 месяцев не приводило к заметным изменениям структуры клеточных элементов, но на 2'3% возрастало число канальцев со слущенными половыми клетками, и уменьшалась средняя площадь канальца. У животных, употреблявших ЖПМ 3 месяца, в просвете 18'20% канальцев обнаруживались слущенные половые клетки. Почти на треть возрастала масса семенников. При этом средняя площадь канальца уменьшалась на 9'12%. В 8'12% извитых канальцев установлены отчетливые изменения строения. Сперматиды и сперматозоиды в них не определялись, что свидетельствовало об утрате сперматогенной функции [1, 8].

Общее количество сперматоцитов и сперматогоний сокращалось незначительно (на 5'7%). Большинство сперматогоний сохраняло обычную структуру, во многих из них встречались фигуры митоза (рис. 1, б). За счет обеднения канальцев сперматогенными клетками индекс сперматогенеза уменьшался в среднем на 10% по сравнению с контрольными 1 и 2. Строение сустентоцитов и гландулоцитов не претерпевало видимых изменений. На гистохимических препаратах в большинстве извитых канальцев и в интерстициальной ткани не выявлено изменений в интенсивности реакции и распределении ОЛ или ФЛ как при добавлении в пищу подсолнечного масла, так и ЖПМ. В то же время у крыс, употреблявших рыбий жир, примерно в 8'12% канальцев наблюдалось снижение содержания ФЛ. В основном оно затрагивало более дифференцированные сперматогенные клетки, но встречалось и в отдельных сустентоцитах. Интенсивность реакции на ОЛ в этих клетках, напротив, возрастала. Показатели липидного обмена в семенниках менялись незначительно (табл. 1).

Шестимесячное использование в рационе животных ПМ существенно не отражалось на количестве или расположении клеток семенника. В большинстве канальцев регистрировались активные процессы сперматогенеза. Число извитых канальцев со слущенными половыми клетками, средняя площадь семенного канальца и индекс сперматогенеза менялись незначительно, а различия не достигали достоверных значений.

У крыс, получавших в течение 6 месяцев ЖПМ, по сравнению с контролем 1 и 2 отмечены достоверные отклонения всех показателей. Значительно увеличилось число канальцев со слущенными половыми клетками. Их количество в 6'14 раз превышало цифры, установленные в контроле. До 25'30% возрастала доля канальцев, в которых развивались выраженные деструктивные процессы (рис. 1, в). Значительно – на 35'40% – сокращалось количество сперматоцитов, в некоторых канальцах они отсутствовали. Появлялись сперматоциты с уплотненными ядрами и гомогенной базофильной цитоплазмой. На треть уменьшалась средняя площадь семенного канальца. Изменения затрагивали сперматогонии и сустентоциты. Общее количество сперматогониев сокращалось в среднем на 17'20%, уменьшалось число клеток, находившихся в состоянии митотического деления. В результате обеднения канальцев сперматогенными клетками индекс сперматогенеза снижался на 38% по сравнению с интактными животными. Гландулоциты видимых структурных изменений не претерпевали, но их количество несколько возрастало. При этом наблюдались повышение концентрации ХС в семенниках крыс и снижение концентрации ФЛ по сравнению с животными, получавшими ПМ в течение 3 месяцев ($p < 0,05$). В то же время различия соответствующих показателей между двумя контрольными группами были незначительны.

Употребление животными ЖПМ вызывало более серьезные изменения исследуемых параметров: относительно контроля 1 более чем на треть повышалась концентрация ХС и на 18,5% снижалось содержание ФЛ ($p < 0,05$). По сравнению с контролем 2 разница значений этих показателей липидного обмена ввиду одинаковой направленности их отклонений хотя и достоверна, но не столь значительна. Исключение составило отношение ХС/ФЛ, которое у третьей группы крыс возрастало в 1,5 раза (табл. 1).

У животных 2'й группы в этот период видимых изменений содержания и характера распределения ФЛ и ОЛ в сперматогенном эпителии, сустентоцитах и гландулоцитах не выявлено, но до 5'6% увеличивалось число профилей канальцев, сперматогенные клетки которых обнаруживали пониженную реакцию на ФЛ. Как правило, в этих же канальцах отмечалось накопление суданофильных включений, причем не только в дифференцированных клетках сперматогенного эпителия, но и в отдельных сустентоцитах.

У крыс, получавших в течение полугода ЖПМ, число канальцев с отклонениями реакции на ФЛ или ОЛ возрастало до 20'25%. В некоторых из них отмечалось

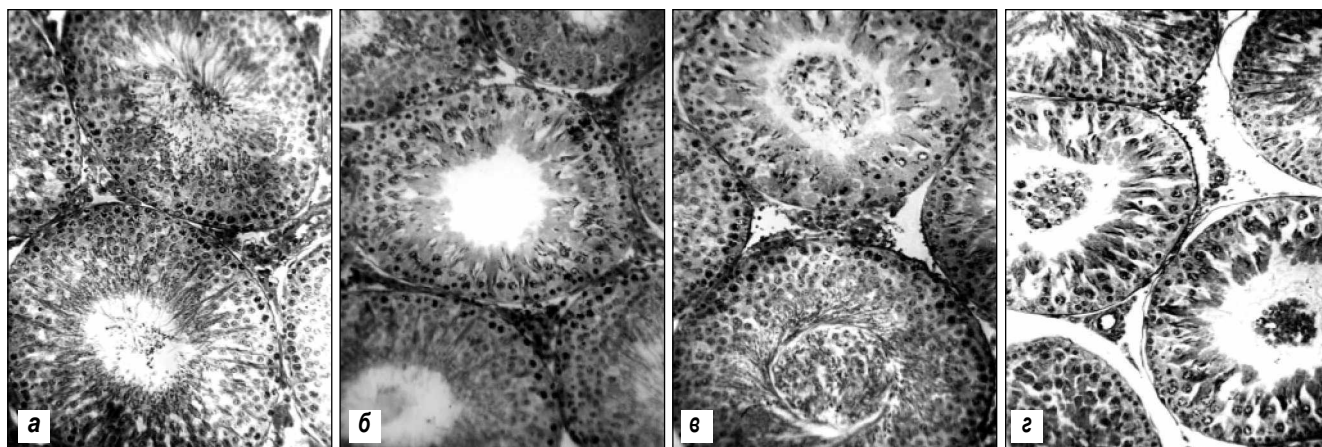


Рис. 1. Структура извитых канальцев семенников в контроле (а) и у животных, получавших жир печени минтая в течение 3 (б), 6 (в) и 12 (г) месяцев, пояснения в тексте. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 160$.

отчетливое снижение содержания ФЛ в клетках сперматогенного эпителия: в ядрах сперматид и в большинстве сперматоцитов они не определялись, а в цитоплазме клеток мелкие гранулы ФЛ встречались только на периферии. В сперматогониях и большей части суспензоточитов плотность расположения гранул, их величина и локализация практически не менялись. При окраске препаратов суданом черным В было видно, что в цитоплазме сперматид и сперматоцитов таких канальцев заметно увеличивались количество и величина липидных включений, которые в виде капель величиной $2\text{--}5\text{ мкм}$ лежали на периферии клеток. В некоторых клетках липидные включения почти полностью заполняли цитоплазму, оставляя свободной лишь узкую зону вокруг ядер. Заметим, что наряду с указанными встречались канальцы, в которых сперматогенный эпителий обнаруживал явное усиление реакции на ФЛ и снижение реакции на ОЛ. Нередко такие канальцы, а их доля составляла $6\text{--}8\%$, располагались в непосредственной близости от канальцев с «инвертированной» реакцией клеток.

Большинство гландулоцитов не демонстрировало в этот период изменений реакции на ФЛ и ОЛ в ответ на воздействие ЖПМ. Лишь на $3\text{--}4\%$ увеличилось количество клеток, в которых наблюдалось усиление или ослабление реакции на эти липиды по сравнению с контролем 1 и 2.

У животных, получавших в течение 12 месяцев подсолнечное масло, наблюдались увеличение числа канальцев со спущенными половыми клетками и уменьшение средней площади семенного канальца. По сравнению с контролем 1 рост показателей составил, соответственно, 10 и 14%. В абсолютном большинстве канальцев структура сперматогенных клеток и суспензоточитов не менялась. Общее количество измененных извитых канальцев не превышало $3\text{--}5\%$. Одновременно достоверно изменялись показатели липидного обмена. По сравнению с контролем 1 концентрация ХС увеличилась на $19,6\%$, а ФС снижалась на $13,7\%$ ($p < 0,05$). У животных, получавших ЖПМ в течение 12 месяцев, величина всех исследованных показателей изменилась на $30\text{--}40\%$ больше, чем у крыс, употреблявших его в те

чение 6 месяцев, а доля канальцев с деструктивными явлениями достигла $55\text{--}60\%$.

При микроскопическом исследовании обращал на себя внимание гетероморфизм изменений в стенке извитых канальцев. Наряду с канальцами, сохранившими неизменную структуру, встречались такие, в которых сперматогенные клетки полностью или частично разрушались (рис. 1, г). В просвете канальцев обнаруживались измененные сперматоциты, а около оболочки канальца определялись суспензоточиты, соседствующие с отдельными сперматогониями. В интерстициальной ткани увеличивалось число крупных гландулоцитов, которые концентрировались вокруг кровеносных сосудов. Направленность изменений показателей липидного обмена в данном случае имела сходный характер с установленной в контроле 2, но сами изменения были выражены в большей степени. Уровень ХС превышал показатели контролей 1 и 2 на 67 и $39,7\%$, а сокращение концентрации ФЛ составляло $29,8$ и $18,6\%$ ($p < 0,05$). Характерно изменение отношения ХС/ФЛ у контрольных и экспериментальной групп животных: незначительное повышение у крыс, получавших подсолнечное масло, в том числе длительное время, и резкое увеличение значений показателя (почти в $2,5$ раза) при воздействии рыбьего жира.

При окраске препаратов сульфатом нильского голубого в контроле 2 зарегистрировано умеренное снижение активности реакции в клетках $10\text{--}15\%$ канальцев. В основном страдали сперматиды и сперматоциты. Значительно реже снижение активности реакции отмечалось в гландулоцитах и лишь в единичных случаях — в сперматогониях и суспензоточитах. При суданировании препаратов наблюдается усиление реакции на ОЛ не только в клетках сперматогенного эпителия, но и в гландулоцитах. В некоторых из них липидные гранулы заполняли всю цитоплазму, оставляя свободным узкий ободок вокруг ядра. Известно, что употребление в пищу больших количеств растительных масел, богатых жирными кислотами $\pi 6$ семейства, может привести к жировому перерождению клеток и вызвать деструкцию мембран, связанную с перекислением липидов.

В частности, отмечены дистрофические изменения в клетках крови, печени и тонкого кишечника крыс при добавлении в пищу 9'18%'ного орехового масла [3, 5, 11, 12].

Более выраженные изменения в семенниках наблюдались у животных, получавших в течение года ЖПМ. Количество профилей канальцев, в которых отмечалось изменение содержания ФЛ и ОЛ, возрастало до 50'53%. В большинстве клеток содержание ФЛ резко сокращалось. В некоторых канальцах эти липиды полностью исчезали из всех сперматид и сперматоцитов, большей части сперматогоний, а в суспенциях определялись в виде пылевидных гранул на периферии цитоплазмы. Суданофильные гранулы нередко заполняли всю цитоплазму таких клеток. Изменения, протекавшие по типу жировой дистрофии, затрагивали и гранулоциты. Обычно в большей степени страдали клетки, расположенные около извитых канальцев с выраженными изменениями сперматогенного эпителия.

В то же время в части канальцев (7%) отчетливо усиливалась реакция клеток на ФЛ. Крупные глыбки предципитата откладывались в цитоплазме сперматид и сперматоцитов, отдельных сперматогониев и суспенций. Зачастую такие канальцы располагались в непосредственной близости от канальцев с низкой активностью ФЛ. Длительное употребление ЖПМ вызывало деструкцию сперматогенных клеток в части извитых канальцев. При этом величина показателей липидного обмена в экстракте семенников и направленность их изменений были тесно связаны с продолжительностью употребления ЖПМ. В первые три месяца использования препарата в семенниках наблюдались увеличение содержания ФЛ и значительное снижение содержания ХС. По имеющимся данным, именно гиполипидемическое (гипохолестеринемическое, гипов'липипротемическое, гипотриглицеридемическое) и мембраностабилизирующее (связанное с повышением концентрации мембраносвязанных ФЛ) действие ЖПМ позволяет снизить риск сердечно-сосудистых заболеваний [2, 5, 11]. Однако с увеличением продолжительности употребления рыбьего жира отмечается все более выраженное сокращение концентрации ФЛ и увеличение ХС.

Как известно, даже умеренное снижение уровня ФЛ, проходящее на фоне повышения уровня ХС, приводит к ограничению подвижности жирных кислот, увеличению микровязкости липидов и жесткости мембран [3, 12]. Вследствие этого нарушаются структура мембранных ферментов и тесно связанная с ними обменно-трофическая функция цитомембран. Длительное употребление рыбьего жира сопровождается дистрофическими изменениями клеток сперматогенного эпителия. В извитых канальцах семенников в первую очередь и в большей степени страдают дифференцированные половые клетки. В этот период нередко встречаются профили канальцев, в которых ФЛ практически полностью исчезают из сперматид и сперматоцитов, а цитоплазма этих клеток перегружается липидными включениями. Значительно реже жировой дистрофии подвергаются

сперматогонии, суспенциты и гранулоциты. Вполне вероятно, что негативный эффект ЖПМ в отношении сперматогенных клеток обусловлен высоким содержанием в рыбьем жире витамина А. Аналогичные, часто более выраженные изменения многие авторы отмечали в извитых канальцах при введении животным соответствующих доз ретинола или ретиноловой кислоты [1, 2, 3, 8, 11, 13]. Поэтому для предотвращения неблагоприятного воздействия ЖПМ на семенники необходимо ограничить срок его употребления до 1'3 месяцев, когда, в соответствии с полученными данными изменения в семенниках минимальны и обратимы.

Литература

1. Вартапетов Б.А., Гладкова А.И.// Пробл. эндокринологии. – 1975. – № 5. – С.113_117.
2. Ильина Е.Д. Звероводство. – М.: Колос. – 1975.
3. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. – Л.: Наука, 1984.
4. Рузен Ранге Э. Сперматогенез у животных. – М.: Мир. – 1980.
5. Титов В.Н.// Вопр. питания. – 1999. – № 3. – С. 34_41.
6. Черток В.М., Ботвич Т.А.// Бюлл. exper. биол. и мед. – 1997. – № 3. – С. 340_343.
7. Черток В.М., Ботвич Т.А.// Бюлл. exper. биол. и мед. – 1998. – № 6. – С. 699_701.
8. Bagavandoss P, Midgley A.C.// Endocrinology. – 1987. – No. 1. – P. 420_428.
9. Liu Li_Ying, Wen Ji_Fang, Tu Jiang_Hua et al.// Chin. J. Arterioscler. – 2002. – No. 1. – P. 1_5.
10. Menender R., Mas R., Amor A.M. et al.// Can. J. Physiol. and Pharmacol. – 2002. – No. 1. – С. 13 – 21.
11. Pich L.A., Draper N.N., Cole P.D.// Lipids. – 1988. – No. 4. – P. 370_371.
12. Velzing_Aarts F.V., van der Klis F.R.M., van der Dijks F.P.L. et al.// Prostagland., Leukotrienes and Essen. Fatty Acids. – 2001. – No. 1. – С. 51_57.
13. Verschuren P.M.// Food and Chem. Toxicol. – 1989. – No. 1. – P.35_44.

Поступила в редакцию 05.06.03.

CHANGES OF THE STRUCTURE AND LIPID METABOLISM IN RAT TESTICLES UNDER THE INFLUENCE OF COD'LIVER OIL

V.M. Chertock, T.A. Botvich, M.A. Khasina, O.A. Artyukova
Vladivostok State Medical University

Summary – The rat testicles were examined with morphologic and biochemical methods in 1, 3, 6 and 12 months after adding the cod' liver oil to food mixture on the basis of 0,1 g/kg of body weight. After cod' liver oil use within 1 ' 3 months, some degenerative changes of the spermatozoa and spermatids came to light at 8'12 per cent of convoluted seminiferous tubules. The cholesterol concentration has reduced almost by 20 per cent, and the phospholipid content of the lipid extract of testicles has increased by 16 per cent. Drug application within 6 ' 12 months has resulted in lesion of spermatocytes and spermatogones at 30'60 per cent of tubules, in increase of the testicle cholesterol level, in fatty degeneration of some part of gametes. Moreover, it was noted that differentiated elements of spermatogenic epithelium of convoluted seminiferous tubules suffered to a greater extent that, possibly, had been brought about by retinol high doses coming into organism along with cod' liver oil.

Pacific Medical Journal, 2003, No. 2, p. 64_67.