



## Исследование клеток Сертоли и сперматогенных клеток крыс при экспериментально индуцированном метаболическом синдроме и проведении бальнеофизиотерапии

О.Л. Коломиец<sup>1</sup>, Е.Е. Брагина<sup>2,3</sup>, А.А. Кашинцова<sup>1</sup>, В.Е. Спангенберг<sup>1</sup>, Л.А. Никулина<sup>4</sup>,  
Л.В. Михайлик<sup>4</sup>, Ю.Н. Королев<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; Россия, 119991 Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 115522 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

<sup>4</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России; Россия, 121099 Москва, ул. Новый Арбат, 32

**Контакты:** Оксана Леонидовна Коломиец [olkolomiets@mail.ru](mailto:olkolomiets@mail.ru)

**Введение.** Метаболический синдром (МС) может быть причиной нарушения сперматогенеза и ухудшения параметров спермограммы. Однако механизмы влияния МС на формирующиеся сперматогенные клетки остаются неясными. Сложность этой актуальной проблемы андрологии и репродуктологии и противоречивость опубликованных данных свидетельствуют о целесообразности использования экспериментальных моделей МС для ее решения.

**Цель исследования** — изучение особенностей течения профазы I мейоза и активности процессов фагоцитоза и аутофагии в клетках Сертоли крыс с экспериментально вызванным МС и при проведении лечебно-профилактических процедур во время развития экспериментального МС.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 12 половозрелых самцах крыс. Животные были разделены на 3 равные группы: 1-я группа — самцы, рацион питания которых был стандартным; 2-я группа — самцы, рацион которых в течение 60 сут характеризовался высоким содержанием жира и фруктозы; 3-я группа — самцы, получавшие сульфатные минеральные воды и подвергавшиеся воздействию низкоинтенсивного электромагнитного излучения сверхвысокой частоты. Клетки семенников исследовали с помощью световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Впервые у животных с МС проведено иммуноцитохимическое исследование особенностей синапсиса хромосом в профазе I мейоза на основе анализа распластанных синаптонемных комплексов мейотических хромосом и иммуноцитохимического анализа клеток Сертоли и клеток сперматогенного ряда в препаратах давленных клеток семенных канальцев. Для статистической обработки данных использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента и непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни.

**Результаты.** В результате гистологического исследования структуры семенных канальцев животных 3 групп выявлено статистически значимое снижение индекса сперматогенеза во 2-й и 3-й группах по сравнению с контролем. Иммуноморфологически в распластанных ядрах первичных сперматоцитов крыс 2-й и 3-й групп обнаружены нарушения архитектоники ядер, формирование фрагментов синаптонемных комплексов, а также многочисленных включений, окрашивающихся антителами к белку SCP3. Признаки пахитенного ареста выявлены в 40–50 % ядер сперматоцитов у крыс 2-й группы. При исследовании препаратов давленных клеток семенных канальцев крыс 2-й и 3-й групп в цитоплазме клеток Сертоли обнаружены следы фагоцитированных синаптонемных комплексов, что доказано с помощью окрашивания антителами к белку SCP3. Таким образом, получены доказательства фагоцитоза дегенерирующих первичных сперматоцитов клетками Сертоли. В клетках Сертоли, сперматоцитах и сперматиде обнаружено множество аутофагосом, маркером которых является белок LC3B. Наличие аутофагосом в клетках Сертоли и клетках сперматогенного ряда у животных этих 2 групп подтверждено и при электронной микроскопии. У самцов крыс 2-й группы выявлены значительные нарушения в структуре пахитенных ядер. В цитоплазме клеток Сертоли и сперматиде крыс 2-й группы выявлены липидные капли, многочисленные фаголизосомы, содержащие клеточный детрит. Обнаружено повреждение структуры и фагоцитоз митохондрий в клетках Сертоли и сперматоцитах. Аутофагия в клетках Сертоли и клетках сперматогенного ряда была наиболее ярко выражена у животных 3-й группы.

**Заключение.** У самцов крыс с экспериментальным МС выявлены значительные нарушения в структуре ядер мейотических клеток, высокое содержание первичных сперматоцитов с признаками пахитенного ареста. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, сообщавших о снижении количества сперматозоидов в эпидидмисах крыс и мышей при моделировании МС. Предполагается, что активация аутофагии является важным фактором поддержки жизнеспособности клеток Сертоли и половых клеток в стрессовых ситуациях, в том числе при МС. По-видимому, аутофагия выступает как адаптивный механизм, обеспечивающий удаление остатков апоптических сперматогенных клеток, подвергшихся селекции в результате развития МС.

**Ключевые слова:** метаболический синдром, сперматогенез, мейоз, синаптонемный комплекс, сперматоциты, сперматиды, клетки Сертоли, аутофагия, сульфатные минеральные воды, низкоинтенсивное электромагнитное излучение сверхвысокой частоты

**Для цитирования:** Коломиец О.Л., Брагина Е.Е., Кашинцова А.А. и др. Исследование клеток Сертоли и сперматогенных клеток крыс при экспериментально индуцированном метаболическом синдроме и проведении бальнеофизиотерапии. Андрология и генитальная хирургия 2020;21(4):76–88.

## Study of Sertoli cells and spermatogenic cells in rats with experimentally induced metabolic syndrome and after balneophysiotherapy

O.L. Kolomiets<sup>1</sup>, E.E. Bragina<sup>2,3</sup>, A.A. Kashintsova<sup>1</sup>, V.E. Spangenberg<sup>1</sup>, L.A. Nikulina<sup>4</sup>, L.V. Mikhailik<sup>4</sup>, Yu.N. Korolev<sup>4</sup>

<sup>1</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina St., GSP-1, Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

<sup>3</sup>A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; Bld. 40, 1 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia;

<sup>4</sup>National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Ministry of Health of Russia;

32 Novy Arbat St., Moscow 121099, Russia

**Introduction.** Metabolic syndrome (MS) can cause impaired spermatogenesis and a decrease in sperm counts. However, the details of the effect of MS on developing spermatogenic cells remain unclear. Difficulties in solving this problem, the inconsistency of published clinical data, indicate the advisability of using experimental models to solve this urgent problem of andrology and reproductology.

**The study objective** is to describe to investigate the specifics of the course of meiotic prophase I and the activity of the processes of phagocytosis and autophagy in Sertoli cells of rats with experimentally induced MS and in the course of therapeutic and prophylactic procedures during the development of experimental MS.

**Materials and methods.** The animals were divided into three groups, each of which included four sexually mature male rats: 1<sup>st</sup> group – males fed a standard diet; 2<sup>nd</sup> group – males receiving a diet high in fat and fructose for 60 days; 3<sup>rd</sup> group – males with MS receiving sulphate mineral waters therapy, low-intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation therapy. Testicular cells were examined using light and transmission electron microscopy. For the first time in animals with MS, an immunocytochemical study of the peculiarities of chromosome synapsis in prophase I of meiosis was carried out on the basis of analysis of spread synaptonemal complexes of meiotic chromosomes and immunocytochemical analysis of Sertoli cells and spermatogenic cells in squashed preparations of seminiferous tubules. The parametric Student's *t*-test and the nonparametric Mann–Whitney *U*-test were used for statistical data processing.

**Results.** As a result of a histological study of the structure of the seminiferous tubules of animals of three groups, a statistically significant decrease in the indices of the spermatogenesis index in 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups compared to the control was revealed. Immunomorphologically, in the spread nuclei of primary spermatocytes of rats of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups, violations of the architectonics of nuclei, the formation of synaptonemal complexes fragments and circular synaptonemal complexes, numerous atypical inclusions were found. Signs of pachytene arrest were found in 40–50 % of spermatocyte nuclei. In the study of squashed cells preparations of the seminiferous tubules of rats of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups, signs of phagocytosed synaptonemal complexes were found in the cytoplasm of Sertoli cells, which were confirmed using antibodies to the SCP3 protein. Thus, evidence for the phagocytosis of degenerating primary spermatocytes by Sertoli cells has been obtained. In Sertoli cells, spermatocytes and spermatids, many autophagosomes are found, using LC3B protein marker. The presence of autophagosomes in Sertoli cells and spermatogenic cells in animals of these two groups was also confirmed by electron microscopy. In male rats of the 2<sup>nd</sup> group, significant disturbances in the structure of the pachytene nuclei were revealed. In the cytoplasm of Sertoli cells and spermatids of rats of the 2<sup>nd</sup> group, lipid droplets, numerous phagolysosomes containing cell detritus were revealed. Structural damage and phagocytosis of mitochondria were found in Sertoli cells and spermatocytes. Autophagy in Sertoli cells were most distinctive in animals of the 3<sup>rd</sup> group.

**Conclusion.** In male rats with experimental MS, significant disturbances in the structure of the nuclei of meiotic cells, a high content of primary spermatocytes with signs of pachytene arrest were revealed. The results obtained are in good agreement with the data of other authors, who revealed a decrease in the number of spermatozoa in the epididymis of rats and mice when modeling MS. It is assumed that the activation of autophagy is an important factor in supporting the viability of Sertoli cells and supporting the viability of germ cells in stressful situations, including MS. Apparently, autophagy is an adaptive mechanism that removes the remnants of apoptotic spermatogenic cells that are selected as a result of MS development.

**Key words:** metabolic syndrome, spermatogenesis, meiosis, synaptonemal complex, spermatocytes of spermatids, Sertoli cells, autophagy, sulphate mineral waters, low-intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation

**For citation:** Kolomiets O.L., Bragina E.E., Kashintsova A.A. et al. Study of Sertoli cells and spermatogenic cells in rats with experimentally induced metabolic syndrome and after balneophysiotherapy. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2020;21(4):76–88. (In Russ.).

### Введение

Метаболический синдром (МС) – комплекс метаболических нарушений, который включает как минимум 3 компонента: абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность и дислипидемию. Высокая распространенность МС, в том числе среди лиц репродуктивного возраста, рассматривается как фактор риска нарушения

фертильности [1]. Внимание к проблеме влияния МС и ожирения на мужскую фертильность заметно возросло в середине 90-х годов прошлого века, когда было выявлено прогрессивное ухудшение количественных и качественных параметров спермограммы во многих регионах мира. Как причины этого явления рассматривались инфекционные заболевания, широкое



применение в быту хлорсодержащих органических веществ, прием лекарственных препаратов, в том числе антибиотиков, вредные привычки, ожирение [1, 2].

Актуальность проблемы влияния МС и ожирения на фертильность мужчин связана с высокой частотой бесплодия, которое диагностируют, по разным данным, в 10–15 % пар репродуктивного возраста. При этом приблизительно в 50 % случаев репродуктивные неудачи обусловлены мужским бесплодием, а у 20 % пациентов причину бесплодия установить не удается [3].

Следует подчеркнуть, что ожирение выявляют у 34 % пациентов репродуктивных клиник, а увеличение индекса массы тела – у 40 % [4]. Известно также, что ожирение у мужчин может отрицательно влиять не только на фертильность, но и на результаты использования вспомогательных репродуктивных технологий [5].

К настоящему времени проблеме связи между ожирением и нарушением сперматогенеза посвящено множество публикаций, причем исследования выполнены на больших когортах пациентов. Одни авторы обнаруживают связь между ожирением и ухудшением качества сперматозоидов у мужчин [5–7]. Так, L.M. Davidson и соавт. показали, что ожирение приводит к изменению основных параметров спермограммы и структуры хроматина сперматозоидов. Эти авторы предположили, что избыток жировой ткани нарушает соотношение тестостерона и эстрогена, а снижение выработки тестостерона, в свою очередь, вызывает гомеостатическое разрушение инсулина и нарушение взаимодействия глобулина, связывающего половые гормоны, лептина и ингибина В [7]. Однако A.A. MacDonald и соавт. на основании метаанализа данных 6800 пациентов с ожирением пришли к заключению об отсутствии связи между ожирением и нарушением основных параметров эякулята [8].

Очевидно, противоречия при оценке роли МС и ожирения в возникновении нарушений сперматогенеза могут объясняться наличием в анамнезе пациентов травм, вирусных и бактериальных инфекций, влиянием их терапии, а также воздействием факторов окружающей среды, особенностей образа жизни, вредных привычек, носительством трудно выявляемых мейотических мутаций. Ввиду этого особый интерес вызывает возможность создания экспериментальной модели МС и исследования его влияния на сперматогенез в эксперименте на животных.

Интересно, что R.M. Viguera-Villaseñor и соавт. не обнаружили изменений тестикулярной ткани у крыс с ожирением, вызванным диетой с высоким содержанием жиров, но установили увеличение количества апоптотических сперматозоидов в просвете эпидидимиса [9]. M.D. Gómez-Elías и соавт. также не выявили изменений морфологии сперматозоидов и нарушений акросомной реакции у самцов мышей с экспериментально вызванным МС, однако обнаружили уменьше-

ние количества сперматозоидов [1]. По мнению этих авторов, нарушение фертильности у пациентов с ожирением, выявляемое в клинических исследованиях, может быть результатом совокупного влияния экологических и/или генетических факторов [1].

Вместе с тем известно, что уменьшение количества сперматозоидов может быть связано и с активной селекцией их предшественников на разных стадиях сперматогенеза, в том числе селекцией сперматоцитов с нарушениями архитектоники ядер и синапсиса гомологичных хромосом [10].

Особый интерес в условиях развития МС, несомненно, представляет взаимодействие клеток сперматогенного ряда с клетками Сертоли, с которыми они связаны на всем пути дифференцировки от сперматогониев до зрелых сперматид и продвижения от базального компартмента стенки извитого канальца до апикального. Клетки Сертоли играют ключевую роль в контроле сперматогенеза. Их функции заключаются в обеспечении структурной поддержки и питания развивающихся половых клеток, их самообновления и дифференцировки, селекции и фагоцитоза и аутофагии дегенерирующих половых клеток, высвобождения зрелых сперматид из стенки канальца. Однако механизмы селекции сперматогенных клеток в условиях развития МС, влияние МС на диплоидные клетки семенника (сперматогонии и сперматоциты) остаются неясными, так же как и особенности взаимодействия сперматоцитов с клетками Сертоли.

Известно, что как в клетках Сертоли, так и в гаплоидных незрелых половых клетках аутофагия является одним из важнейших механизмов спермиогенеза и может усиливаться в ответ на действие различных факторов. Поэтому в настоящем исследовании особое внимание было уделено выявлению признаков аутофагии в диплоидных и гаплоидных клетках семенного канальца у животных с МС, в том числе после его терапии.

**Целью** настоящего исследования стало комплексное изучение особенностей разных этапов сперматогенеза у самцов крыс в условиях формирования МС и у самцов крыс с экспериментальным МС, получавших сульфатные минеральные воды (МВ) и подвергнутых воздействию низкоинтенсивного электромагнитного излучения сверхвысокой частоты (ЭМИ СВЧ) в качестве лечебно-профилактических средств.

Актуальность исследования мейоза у животных с экспериментально смоделированным МС продиктована тем, что мейоз является хромосомной основой репродукции, а ошибки в прохождении его этапов могут приводить к аресту мейоза, формированию анеуплоидных половых клеток и/или бесплодию.

#### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 12 нелинейных крысах-самцах массой 180–200 г. Все животные были разделены

на 3 равные группы. В 1-ю группу (контрольную) включены интактные крысы, получавшие стандартный корм в обычном количестве; во 2-ю группу – крысы, питание которых было высококалорийным, с высоким содержанием насыщенных жиров и углеводов (с добавлением 20 % маргарина к стандартному корму и 20 % раствора фруктозы в качестве питья); в 3-ю группу – крысы, питание которых было аналогично питанию крыс 2-й группы, но при этом они получали питьевую сульфатную МВ и подвергались воздействию низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ.

Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к раствору фруктозы и обогащенному жиром корму (2-я и 3-я группы), водопроводной воде и стандартному корму (1-я группа).

Питьевую сульфатную МВ вводили крысам ежедневно внутривенно 1 раз в день через иглу с оливой на конце. Введение начинали на 12-й день от начала моделирования МС, курс состоял из 22 процедур.

Низкоинтенсивному ЭМИ СВЧ (курс из 12 процедур) крыс подвергали после завершения курса МВ. Ежедневно воздействовали ЭМИ СВЧ на поясничную область в зоне проекции надпочечников с помощью аппарата «Акватон-2» (плотность потока мощности 1 мкВт/см<sup>2</sup>, частота около 1000 МГц). Облучение проводили с расстояния 2–3 см от поверхности кожи.

Животных выводили из эксперимента путем дисклокации шейных позвонков на следующий день после окончания курса процедур. Продолжительность эксперимента составляла 60 дней.

Эксперимент выполнен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755) и требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986).

В первую очередь было проведено гистологическое исследование ткани семенников как подопытных, так и контрольных самцов крыс. Исследование включало иммуно-цитохимический анализ тотальных препаратов синаптонемных комплексов (СК) в распластанных ядрах сперматоцитов I порядка. СК – специфическая только для профазы I мейоза структура ядра сперматоцита, которая формируется между 2 синаптирующими гомологичными хромосомами. СК формируется между гомологами вдоль всего мейотического бивалента и служит каркасом для прохождения ключевых событий профазы I мейоза – формирования двунитевых разрывов ДНК (double strand breaks), их репарации, синапсиса, кроссинговера. Структура СК является признанным индикатором нарушений мейоза у животных и человека [11, 12]. Кроме того, проведено иммуноцитохимическое и электронно-микроскопическое исследование клеток Сертоли и гаплоидных клеток сперматогенного ряда с особым вниманием к процес-

сам фагоцитоза и аутофагии в них у животных с МС, в том числе подвергнутых терапии с использованием МВ и низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ. Такая терапия способна оказывать общезащитное, антиоксидантное и цитопротекторное действие [13–16]. Предполагалось, что сочетанное действие этих факторов может оказать адаптогенное влияние на процессы сперматогенеза в условиях развития МС. Воздействие ЭМИ СВЧ рассматривается как профилактическое средство при действии ряда патогенных факторов на организм человека и животных [16].

**Светооптическое исследование.** Семенники фиксировали в жидкости Буэна, заключали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином Эрлиха с докраской эозином. Для оценки состояния сперматогенеза подсчитывали 100 извитых семенных канальцев (ИСК) с различным количеством генераций половых клеток (от 4 до 0). Индекс сперматогенеза оценивали по определенной доли (в %) ИСК с различным числом генераций половых клеток [17]. Для статистической обработки данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента.

**Электронно-микроскопическое исследование клеток семенных канальцев.** Кусочки ткани семенника фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере (рН 7,2), постфиксировали в 1 % осмиевой кислоте и заливали в эпон. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut III (Reichert, Германия) с помощью алмазного ножа (Diatome, Швейцария), контрастировали цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL, Япония).

Проводили **иммуноцитохимическое исследование** препаратов распластанных ядер первичных сперматоцитов и препаратов давленных клеток семенных канальцев. Препараты распластанных ядер получали по методу J. Navarro и соавт. [18] в собственной модификации [19]. Препараты давленных клеток семенных канальцев получали по методу J. Page и соавт. [20].

В работе использованы следующие **первичные антитела**: мышинные IgG к белку латеральных элементов СК SCP3 (Abcam, ab97672) (в разведении 1 : 100) или кроличьи IgG к белку SCP3 (Abcam, ab15903) (в разведении 1 : 250); мышинные IgG к маркеру участков хроматина с незавершенной репарацией двунитевых разрывов ДНК и незавершенным синапсисом хромосом – гистону  $\gamma$ H2AX (Abcam, ab26350); куриные антитела к виментину (ThermoFisher, PA1-10003) (в разведении 1 : 1000); кроличьи IgG к белку LC3B – маркеру аутофагосом (Abcam, ab48394) (в разведении 1 : 250).

В качестве **вторичных антител** использовали: бычьи IgG против IgG кролика, конъюгированные с FITC; козы антитела к IgG мыши, конъюгированные с AlexaFluor 555 или с FITC; куриные антитела к IgG кролика, конъюгированные с AlexaFluor 594; козы антитела к IgG курицы, конъюгированные с AlexaFluor 488.

Иммуноокрашивание препаратов проводили по методу P.V. Moens, W.C. Earnshaw [21]. Препараты инкубировали с первичными антителами при +4° С в течение ночи; промывали в 3 сменах натрий-фосфатного буфера. Далее наносили вторичные антитела и инкубировали препараты в течение 2–3 ч при +37° С. Препараты промывали в натрий-фосфатном буфере и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США), содержащую флюоресцирующий голубой краситель DAPI, избирательно окрашивающий ДНК. На иммуноокрашенных препаратах каждую клетку фотографировали, записывали нониус. В некоторых случаях проводили 2-й и 3-й раунды иммуноокрашивания.

Препараты анализировали с помощью универсального флюоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия), соответствующего стандарту IC2S-оптики, оборудованного объективами Plan-Neofluar (40× и 100×), ртутной лампой НВО, черно-белой CCD-камерой накопления сигнала AxioCam HRm/Rev. 2 (Carl Zeiss, Германия), набором комбинированных фильтров для флюорохромов, имеющего выход на компьютер (Fujitsu-Siemens Technology Solutions, Германия). Документирование фотоизображений выполняли с помощью программы Axiovision Rel. 4.6. Изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, США).

## Результаты

**1. Светооптическое исследование.** Высококалорийная диета не привела к увеличению массы тела крыс, однако наблюдалась тенденция к увеличению массы семенников (табл. 1).

При морфометрическом исследовании процесса сперматогенеза животных 2-й группы, содержащихся на высококалорийной диете, было установлено, что количество ИСК с 4 генерациями клеток уменьшилось на 14,6 % ( $p = 0,05$ ), при этом количество ИСК с 3 генерациями по сравнению с контролем, наоборот, увеличилось (табл. 2). Следовательно, происходило нарушение баланса между ИСК с 4 и 3 генерациями, что

**Таблица 1.** Масса тела и семенников крыс с метаболическим синдромом, в том числе при применении терапии минеральными водами и низкоинтенсивным электромагнитным излучением сверхвысокой частоты

**Table 1.** Body weight and testes weight in rats with experimentally induced metabolic syndrome, during balneotherapy and exposure to low-intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation

Группа Group	Масса тела, г Body weight, g	Масса семенников на 100 г массы тела, мг Testes weight per 100 g of body weight, mg
1	343,2 ± 12,7	1011,2 ± 55,3
2	343,1 ± 31,1	1046,7 ± 80,9
3	330,1 ± 13,5	964,5 ± 40,1

может указывать на замедление (нарушение) процессов спермиогенеза. При этом следует отметить, что ИСК с 2 и 1 генерацией клеток, т. е. с меньшим содержанием клеток, не наблюдалось. Выявленные сдвиги привели к отчетливому снижению индекса сперматогенеза. При терапии МВ + ЭМИ СВЧ число ИСК с 4 генерациями и индекс сперматогенеза у животных 3-й группы были близки к показателям контроля (табл. 2). Вместе с тем статистически значимых сдвигов по сравнению с показателями крыс 2-й группы не обнаружено, по-видимому, в связи с большим разбросом полученных данных. Кроме того, в этой группе отмечено повышенное число слущенных клеток в просвете канальцев, что может свидетельствовать о слабой их сцепленности между собой.

**2.1. Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер первичных сперматоцитов крыс 1-й группы (контрольной).** Исследование распластанных ядер первичных сперматоцитов животных 1-й группы выявило типичную динамику формирования СК от стадии лептотены до стадии ранней пахитены. На стадии лептотены в ядрах сперматоцитов формировались осевые элементы мейотических хромосом, которые хорошо видны при окрашивании антителами к белку SCP3 — основному белку осевых элементов хромосом и латеральных элементов СК.

Динамику репарации запрограммированных разрывов ДНК при движении клеток от стадии лептотены к стадии диплотены отражает результат окрашивания антителами к фосфорилированному гистону  $\gamma$ H2AX — маркеру участков хроматина, содержащих двунитевые разрывы ДНК. На стадии лептотены антитела к гистону  $\gamma$ H2AX окрашивают весь хроматин, при продвижении к стадии зиготены происходит синапсис гомологичных хромосом, сопровождающийся репарацией двунитевых разрывов ДНК и формированием СК. В местах завершения синапсиса и, следовательно, завершения репарации двунитевых разрывов ДНК гистон  $\gamma$ H2AX отсутствует. На стадии пахитены, когда синапсис аутосомом полностью завершен, гистон  $\gamma$ H2AX виден только на асинаптированных осевых элементах хромосом полового (XY) бивалента (рис. 1а). На стадии диплотены аутосомы десинаптируют, половой бивалент смещается на периферию распластанного ядра, формируя типичное половое тельце (рис. 1б). Однако в 16 % ядер сперматоцитов выявлена ассоциация полового бивалента с аутосомами. В единичных ядрах обнаружены мелкие включения.

**2.2. Иммуноцитохимическое исследование препаратов давленных клеток семенных канальцев крыс 1-й группы (контрольной).** Основной задачей такого исследования был анализ активности процессов фагоцитоза и аутофагии в клетках Сертоли в норме и в условиях эксперимента. У самцов 1-й группы не выявлено признаков дегенерации сперматоцитов и их остатков

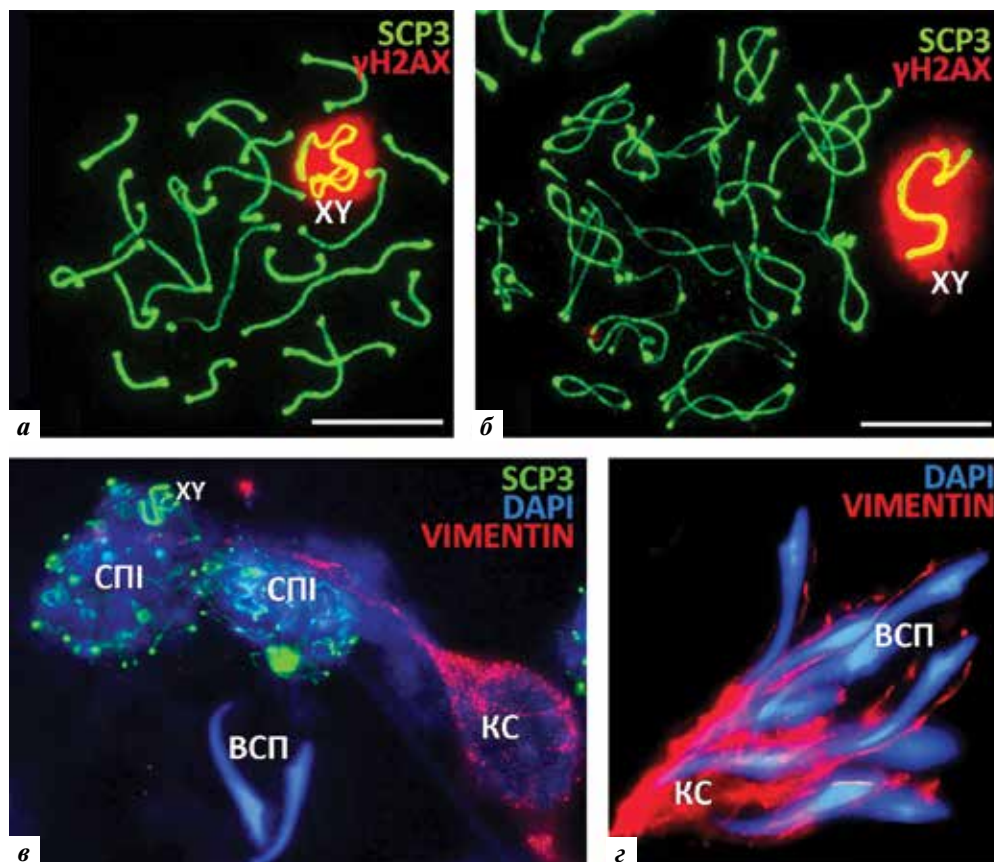
**Таблица 2.** Результаты светооптического исследования срезов семенных канальцев крыс с метаболическим синдромом, в том числе при применении терапии минеральными водами и низкоинтенсивным электромагнитным излучением сверхвысокой частоты

**Table 2.** Results of a light-optical study of seminal tubules sections in rats with experimentally induced metabolic syndrome, during balneotherapy and exposure to low-intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation

Группа Group	Количество извитых семенных канальцев, % The number of convoluted seminiferous tubules, %		Число слуш- ваний Squamous cells number	Индекс сперма- тогенеза Spermatogenesis index	Среднее количество клеток Сертоли на 1 извитый каналец Average number of Sertoli cells per 1 convoluted tubule
	с 4 генерациями with 4 generations	с 3 генерациями with 3 generations			
1	68,70 ± 3,19	31,30 ± 3,19	5,80 ± 3,50	3,69 ± 0,03	6,43 ± 0,21
2	58,70 ± 2,10*	41,30 ± 2,10*	2,30 ± 0,42	3,59 ± 0,02*	7,30 ± 0,38
3	71,00 ± 5,04	29,00 ± 5,04	12,70 ± 7,10	3,71 ± 0,05	8,67 ± 0,71**

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  compared to the control.



**Рис. 1.** Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер первичных сперматоцитов (СПИ) (а, б) и давленных клеток семенных канальцев (в, г) крыс 1-й группы (контрольной): а – пахитена. Аутосомы полностью синаптированы и формируют 20 синаптомных комплексов (СК-бивалентов). Половые хромосомы (X и Y) соединены конец в конец. Хроматин X- и Y-хромосом неактивирован; б – диплотена. Асинapsis латеральных элементов СК. Половой бивалент (XY) формирует типичное половое тельце и занимает периферическое положение в ядре. Препараты окрашены антителами к основному белку осевых элементов хромосом и СК SCP3 (зеленый) и фосфорилированному гистону  $\gamma$ H2AX (красный); в, г – сперматоциты I порядка (СПИ), клетки Сертоли (КС), половой бивалент (XY), вытянутые сперматиды (ВСП). Препараты окрашены антителами к виментину – белку промежуточных филаментов (красный), белку SCP3 (зеленый). Сигналы SCP3 не выявлены в клетках Сертоли. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабный отрезок 1 мкм

**Fig. 1.** Immunocytochemical study of spreading nuclei of primary spermatocytes (СПИ) (а, б) and squash seminiferous tubule cells (в, г) of control animals (1<sup>st</sup> group): а – pachytene. Autosomes are completely synapsed and form 20 synaptonemal complexes bivalents. The sex chromosomes (X and Y) are connected end-to-end. Chromatin of XY chromosomes is inactivated; б – diplotene. Asynapsis of the lateral elements of the synaptonemal complexes. The sexual bivalent forms a typical genital sex body and occupies a peripheral position in the nucleus. The preparations were stained with antibodies to the basic protein of the axial elements of chromosomes and synaptonemal complexes SCP3 (green) and phosphorylated histone  $\gamma$ H2AX (red); в, г – primary spermatocytes (СПИ), Sertoli cells (КС); sex bivalent (XY), elongated spermatids (ВСП). The preparations were stained with antibodies to vimentin, a protein of intermediate filaments (red) in the cytoplasm of Sertoli cells. Synaptonemal complexes in the nuclei of spermatocytes are stained with antibodies to the SCP3 protein (green). SCP3 signals were not detected in Sertoli cells. Chromatin is stained with DAPI dye (blue). Bar 1  $\mu$ m

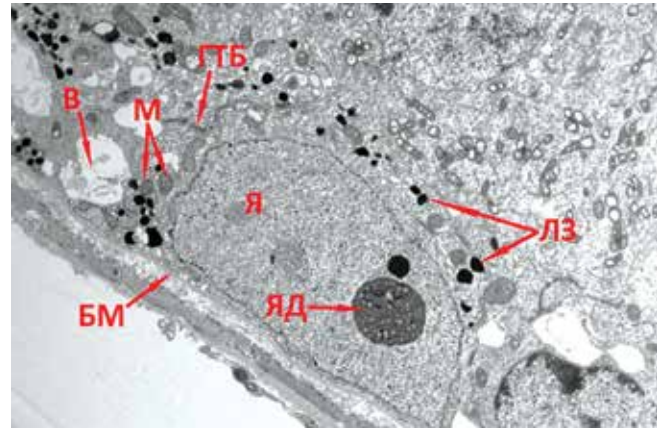
в фагосомах в клетках Сертоли. Не выявлено признаков аутофагии ни в клетках Сертоли, ни в сперматоцитах (рис. 1в, г).

**2.3. Электронно-микроскопическое исследование клеток семенных канальцев крыс 1-й группы (контрольной).** Ультраструктура клеток семенных канальцев крыс 1-й группы имеет типичную морфологию. Клетки Сертоли лежат на базальной мембране, уплощенные ядра содержат диффузный хроматин, ядрышко с типичной морфологией, состоящее из фибриллярного центра, компактного гранулярного компонента и ретикулярного компонента. В цитоплазме выявляются митохондрии, лизосомы, вакуоли, единичные аутофагосомы. Выявляются специализированные контакты между клетками Сертоли, являющиеся компонентом гематотестикулярного барьера (рис. 2). Незрелые половые клетки (сперматогонии, сперматоциты) имеют обычную ультраструктуру [22].

**3.1. Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер первичных сперматоцитов крыс 2-й группы.** У животных этой группы не выявлено отклонений в формировании осевых элементов хромосом на стадиях лептотены и зиготены. Однако на стадии пахитены обнаружены значительные нарушения в архитектонике ядер. В ядрах сперматоцитов выявлены множественные включения различной формы (рис. 3а–в). Причем в одних ядрах преобладали крупные включения округлой (или каплевидной) формы (рис. 3а, б), в других – вытянутые структуры, расположенные вдоль СК (рис. 3б). Встречались и единичные мелкие кольцеобразные включения (рис. 3в). Все перечисленные включения интенсивно связывались с антителами к основному белку СК SCP3, что осложняло идентификацию половых (XY) бивалентов и выявление их связи с аутосомами (рис. 3б). Но в среднем в 40 % ядер сперматоцитов такие ассоциации были выявлены (рис. 3а, в).

**3.2. Иммуноцитохимическое исследование препаратов давленных клеток семенных канальцев крыс 2-й группы** выявило фрагменты дегенерирующих ядер сперматоцитов I порядка (рис. 3д), причем часть из них видна в фагосомах клеток Сертоли, где они обнаруживаются при иммуноокрашивании антителами к белку SCP3 (рис. 3ж). В цитоплазме клеток Сертоли обнаруживается множество аутофагосом, маркером которых является белок LC3В (рис. 3е, ж). Следует отметить, что аутофагосомы выявляются как в сперматоцитах, так и в сперматидеях (рис. 3з). У самцов 1-й группы такие структуры не выявлялись.

**3.3. Электронно-микроскопическое исследование клеток семенных канальцев крыс 2-й группы.** Данные ультраструктурного исследования подтверждают результаты иммуноцитохимического. В цитоплазме клеток Сертоли семенников крыс с МС обнаруживаются многочисленные фаголизосомы, содержащие клеточный детрит (рис. 4а). Так как при иммуноокрашивании



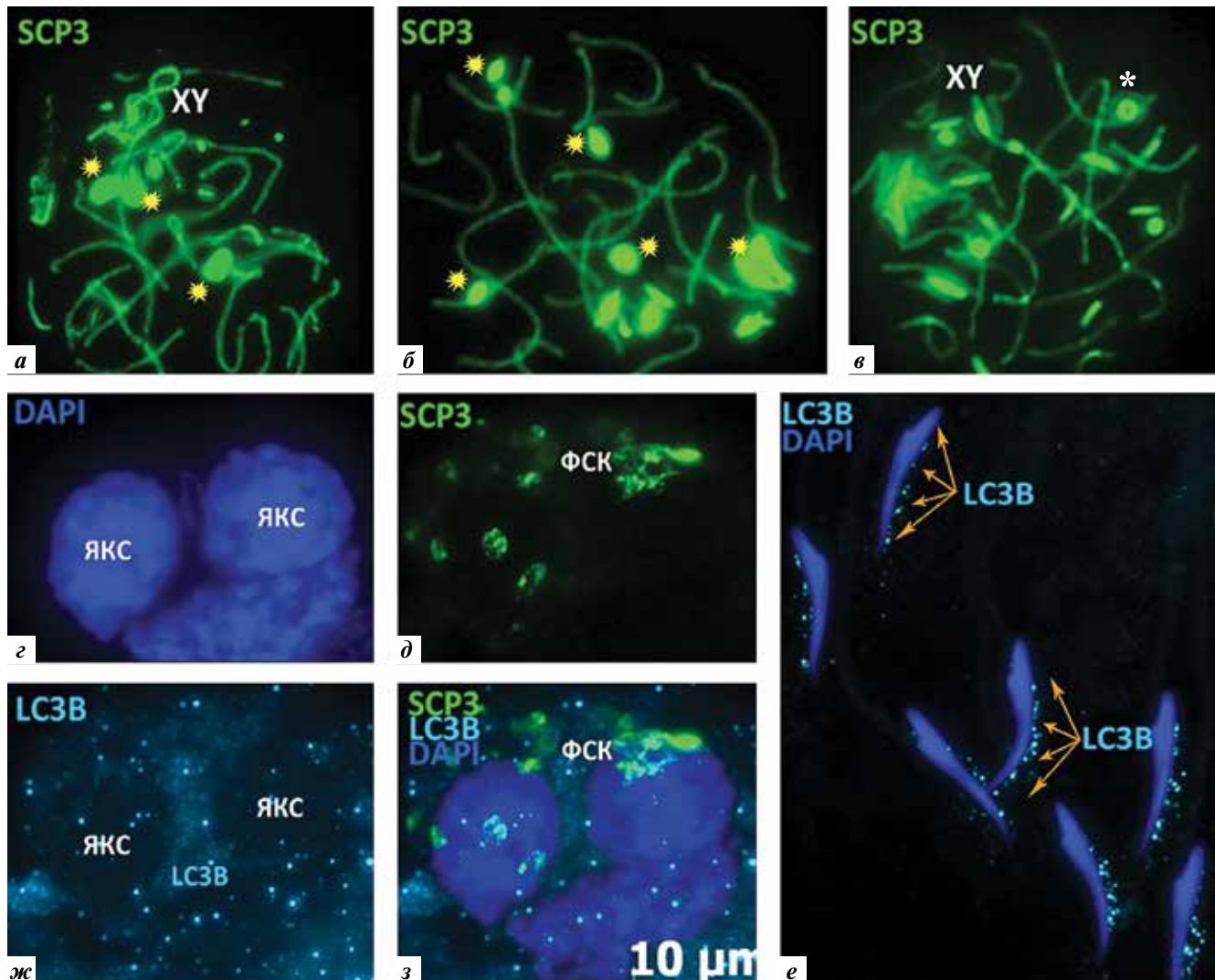
**Рис. 2.** Ультраструктура клеток семенного канальца крысы 1-й группы. Клетка Сертоли лежит на базальной мембране (БМ), ядро (Я) содержит ядрышко (ЯД), в цитоплазме – многочисленные митохондрии (М), лизосомы с электронно-плотным содержимым (ЛЗ) и вакуоли (В). ГТБ – специализированные контакты гематотестикулярного барьера. Масштабный отрезок 10 нм

**Fig. 2.** The ultrastructure of the seminiferous tubule cells of the control rat (1<sup>st</sup> group). The Sertoli cell lies on the basement membrane (БМ), the nucleus (Я) contains the nucleolus (ЯД), in the cytoplasm there are numerous mitochondria (М), lysosomes with electron-dense contents (ЛЗ) and vacuoles (В). ГТБ – specialized contacts of the blood-testicular barrier. Bar 10 nm

в фаголизосомах выявляются фрагменты СК, это, вероятно, фагоцитированные сперматоциты. В структуре базальной мембраны, гематотестикулярного барьера и митохондрий не обнаружено отклонений по сравнению с результатами исследования клеток животных 1-й группы. В цитоплазме клеток Сертоли выявлено большое количество липидных включений и лизосом. Аутофагосомы обнаружены в цитоплазме клеток Сертоли и сперматоцитов и имеют характерную морфологию – фрагмент цитоплазмы, окруженный двойной мембраной (рис. 4б). В цитоплазме клеток Сертоли выявлены также фагофоры – двумембранные незамкнутые образования, предшественники аутофагосом.

**4.1. Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер первичных сперматоцитов крыс 3-й группы** выявило множественные нарушения в структуре СК почти во всех пахитенных ядрах. Но они, как правило, они были мельче, чем в сперматоцитах животных 2-й группы. Причем в одних ядрах преобладали многогранные или палочковидные включения (рис. 5а), в других – мелкие кольцеобразные включения (рис. 5б). Встречались и включения, имеющие сетчатое строение. Независимо от формы все они интенсивно окрашивались антителами к белку SCP3. Также следует отметить наличие в ядрах фрагментов СК и ассоциаций XY-бивалента с аутосомами (рис. 5а, б).

**4.2. Иммуноцитохимическое исследование клеток семенных канальцев крыс 3-й группы.** У животных 3-й группы обнаружена значительная активация аутофагии как в диплоидных клетках – сперматоцитах (рис. 5е)



**Рис. 3.** Иммуноморфологическое исследование клеток семенных канальцев крысы, содержащейся на высококалорийной диете (2-й группы): а–в – распластанные ядра первичных сперматоцитов крысы; а, б – в ядрах сперматоцитов, распластанных на стадии пахитены, видны множественные атипичные включения, окрашивающиеся антителами к белку синаптонемных комплексов (СК) SCP3 (желтые звездочки), фрагменты СК; в – кольцеобразная структура в ядре сперматоцита (белая звездочка). На рис. «а» и «в» половые (XY) биваленты ассоциируют с аутосомами; г–з – препараты клеток семенных канальцев крысы, окрашенные антителами к белкам SCP3 (зеленый) и белку LC3B (голубой). Хроматин окрашен DAPI (синий); г – ядра клеток Сертоли (ЯКС) окрашены DAPI; д – фрагменты СК (ФСК), окрашенные антителами к белку SCP3 (зеленый); е – при окрашивании антителами к белку LC3B (голубой) выявлено множество аутофагосом в клетках Сертоли; ж – совмещение рис. «д» и «е»; з – аутофагосомы в цитоплазме удлинённых сперматид (оранжевые стрелки). Масштабный отрезок 1 мкм

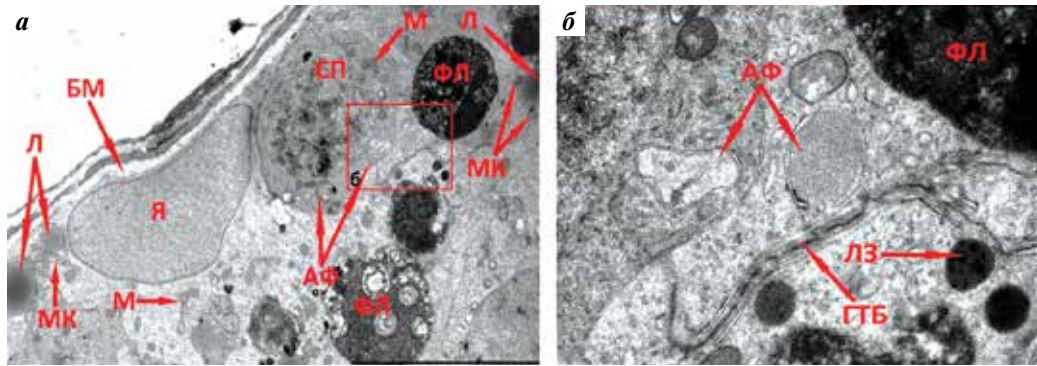
**Fig. 3.** Immunomorphological study of seminiferous tubule cells of rats kept on a high-calorie diet (2<sup>nd</sup> group): а–в – spread nuclei of primary rat spermatocytes; а, б – in the nuclei of spermatocytes spread out at the pachytene stage, multiple atypical inclusions are visible, immunostaining with antibodies to the CK protein SCP3 (yellow asterisks), fragments of CK; в – an annular structure in the nucleus of a spermatocyte (white asterisk). In fig. “а” and “в”, sex (XY) bivalents are associated with autosomes; г–з – preparations of cells of seminiferous tubules of rats. The preparations are stained with antibodies to SCP3 (green) and LCP3 (blue) proteins. Chromatin is stained with DAPI (blue); г – Sertoli cell nuclei (ЯКС) were stained with DAPI dye; д – fragments of synaptonemal complexes (ФСК), stained with antibodies to the SCP3 protein (green); е – immunostaining of the preparation with antibodies to the LC3B protein (blue) reveals many autophagosomes in Sertoli cells; ж – combination and images of fig. “д” and “е”; з – autophagosomes in the cytoplasm of elongated spermatids (orange arrows). Bar 1 μm

и клетках Сертоли (5г), так и в гаплоидных – округлых и вытянутых сперматид (рис. 5ж, з) по сравнению с активностью аутофагии у животных 2-й группы. Плотность фокусов белка LC3B в клетках всех типов была гораздо выше, чем у животных 2-й группы (рис. 5г, е–з).

**4.3. Электронно-микроскопическое исследование клеток семенных канальцев крысы 3-й группы.** Клетки Сертоли и первичные сперматоциты у животных 3-й груп-

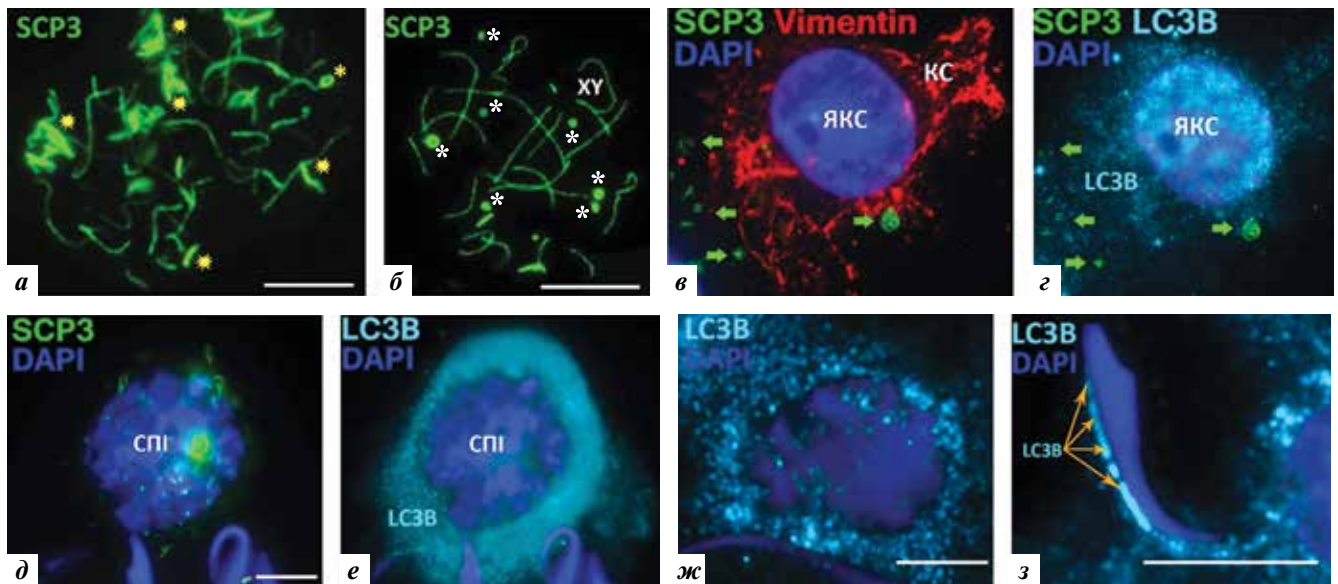
пы, как и соответствующие клетки животных 2-й группы, содержат большое количество фаголизосом, липидных капель и лизосом (рис. 5а, в). В цитоплазме клеток Сертоли и сперматоцитов выявлены аутофагосомы, фагофоры (рис. 5б). Базальная мембрана и гематотестикулярный барьер имеют типичное строение, не отличающееся от такового у интактных животных. Обращает на себя внимание повреждение митохондрий:





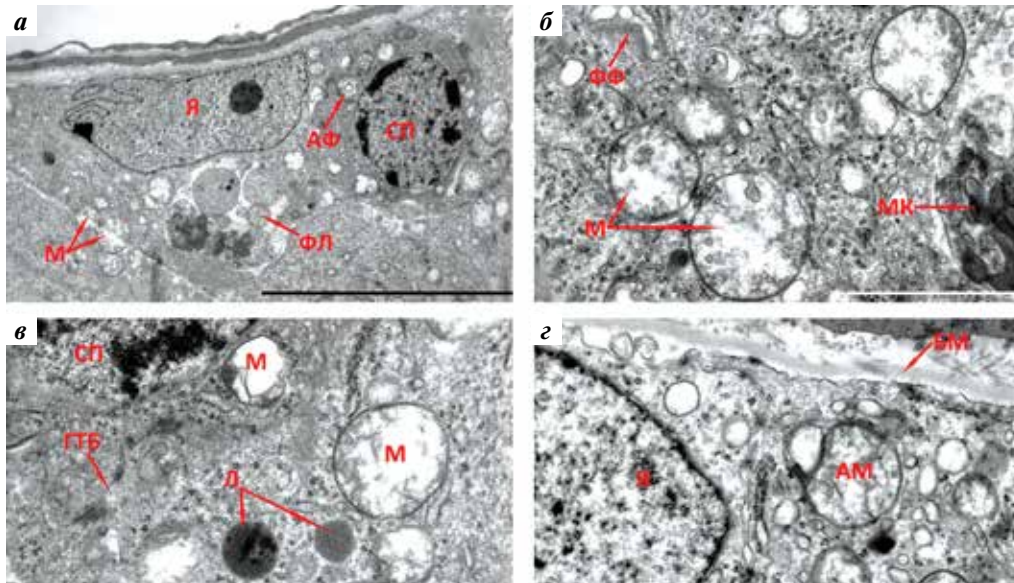
**Рис. 4.** Ультраструктура клеток семенных канальцев крысы, содержащейся на высококалорийной диете (2-й группы): а – в цитоплазме клетки Сертоли видно уплощенное ядро (Я), лежащее вблизи базальной мембраны (БМ), липидные капли (Л) и гигантские фаголизосомы (ФЛ). Митохондрии (М) лежат свободно в цитоплазме, часть митохондрий плотно примыкает к липидным каплям (МК). Аутофагосомы (АФ), представляющие собой фрагмент цитоплазмы, окруженный двойной мембраной, обнаружены в клетке Сертоли и в сперматоците (СП); б – фрагмент рис. «а» при большем увеличении. ГТБ – элемент гематотестикулярного барьера; ЛЗ – лизосомы. Масштабный отрезок 10 нм

**Fig. 4.** Ultrastructure of cells of seminiferous tubules of rats kept on a high-calorie diet (2<sup>nd</sup> group): а – in the cytoplasm of the Sertoli cell, a flattened nucleus (Я) is visible, lying near the basement membrane (БМ); lipid droplets (Л), and giant phagolysosomes (ФЛ). Mitochondria (М) lie freely in the cytoplasm; some mitochondria are tightly adjacent to lipid droplets (МК). Autophagosomes (АФ), which are a fragment of the cytoplasm surrounded by a double membrane, are found in the Sertoli cell and in the spermatocyte (СП); б – fragment of fig. “а” at higher magnification. ГТБ – an element of the blood-testicular barrier; ЛЗ – lysosomes. Bar 10 nm



**Рис. 5.** Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер первичных сперматоцитов (а, б) и давленных клеток семенных канальцев (в–з) крысы, содержащихся на высококалорийной диете, получавших минеральную воду и подвергавшихся воздействию электромагнитного излучения сверхвысокой частоты (3-я группа): а – пахитена. Атипичные структуры в ядре сперматоцита (желтые звездочки) и множественные фрагменты синаптомемных комплексов (СК), окрашенные антителами к белку SCP3 (зеленый); б – пахитена. Множественные кольцеобразные структуры (белые звездочки), окрашенные антителами к белку SCP3 (зеленый). XY – половой СК-бивалент; в – в цитоплазме клеток Сертоли (КС) среди филаментов, окрашенных антителами к виментину (красный) видны фрагменты СК (зеленые стрелки), окрашенные антителами к белку SCP3 (зеленый). ЯКС – ядро клетки Сертоли; г – та же клетка, что и на рис. «в». Множество аутофагосом в цитоплазме клеток Сертоли, окрашенных антителами к белку LC3B; д – ядро давленого первичного сперматоцита (СП), в котором видны остатки СК; е – та же клетка, что на рис. «д». Высокая плотность аутофагосом, маркированных антителами к белку LC3B, в цитоплазме сперматоцита; ж – множество аутофагосом, окрашенных антителами к LC3B, в округлой сперматиде; з – аутофагосомы в цитоплазме удлинённой сперматиды. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабный отрезок 1 мкм

**Fig. 5.** Immunocytochemical study of spreading nuclei of primary spermatocytes (а, б) and cells of squashed preparations of testicular tubules (в–з) obtained from rats kept on a high-calorie diet and receiving balneootherapy and exposure to low-intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation (3<sup>rd</sup> group): а – pachytene. Atypical structures in the nucleus of a spermatocyte (yellow asterisks) and multiple synaptonemal complexes (СК) fragments stained with antibodies to SCP3 (green); б – pachytene. Multiple ring-shaped structures (white asterisks), stained with antibodies to SCP3 protein (green). XY – sex SC bivalent; в – in the cytoplasm of Sertoli cells (КС), among the filaments stained with antibodies to vimentin (red), fragments of SC (green arrows) are visible, stained with antibodies to the SCP3 protein (green); г – the same cell as in fig. “в”. Many autophagosomes are seen in the cytoplasm of Sertoli cells, stained with antibodies to the LC3B protein; ЯКС – the nucleus of Sertoli cell; д – the nucleus of the squashed spermatocyte (СП), in the nucleus of which the remains of SC are visible; е – the same cell as in fig. “д”. High density of autophagosomes, marked with antibodies to the protein to the LC3B protein, in the cytoplasm of the spermatocyte; ж – multiple autophagosomes (LC3B) in a rounded spermatid. Autophagosomes in the cytoplasm of an elongated spermatid. Chromatin is stained with DAPI (blue). Bar 1 μm



**Рис. 6.** Электронная микроскопия клеток семенных канальцев крыс, содержащихся на высококалорийной диете, получавших минеральную воду и подвергавшихся воздействию электромагнитного излучения сверхвысокой частоты (3-я группа): а – в клетке Сертоли выявлены фаголизосомы (ФЛ), содержащие лизированные клетки. Аутофасосома (АФ) видна в сперматоците (СП). Я – ядро клетки Сертоли; М – митохондрии с электронно-прозрачным матриксом. Масштабный отрезок 10 нм; б – фрагмент цитоплазмы клетки Сертоли. Масштабный отрезок 2 нм; в – фаголизосоме выявлен конгломерат митохондрий (МК). Двумембранный серповидный фагофор – предшественник аутофасосомы – виден в цитоплазме клетки Сертоли; г – фрагмент цитоплазмы сперматоцита. В цитоплазме видны лизосомы (Л) и митохондрии, структура которых аналогична структуре митохондрий в клетке Сертоли. ГТБ – специализированные контакты гематотестикулярного барьера. Масштабный отрезок 2 нм; з – фрагмент цитоплазмы клетки Сертоли с митосомой (АМ) – аутофасосомой, окруженной двойной мембраной и содержащей поврежденную митохондрию. Масштабный отрезок 2 нм

**Fig. 6.** Electron microscopy of seminiferous tubule cells of rats kept on a high-calorie diet and receiving balneotherapy and exposure to low-intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation (3<sup>rd</sup> group): а – phagolysosomes (ФЛ) containing lysed cells were found in the Sertoli cell. Autophagosome (АФ) is visible in the spermatocyte (СП). Я – the nucleus of the Sertoli cell; М – mitochondria with an electron-transparent matrix. Bar 10 nm; б – fragment of the Sertoli cell cytoplasm of the A conglomerate of mitochondria (МК) is detected in phagolysosomes. The two-membrane sickle-shaped phagophore, the precursor of the autophagosome, is visible in the cytoplasm of the Sertoli cell. Bar 2 nm; в – fragment of the cytoplasm of the spermatocyte. In the cytoplasm, lysosomes (Л) and mitochondria are visible, the structure of which is similar to the structure of mitochondria in the Sertoli cell. ГТБ – specialized contacts of the blood-testicular barrier. Bar 2 nm; з – a fragment of the cytoplasm of the Sertoli cell with mitosome (АМ) – an autophagosome surrounded by a double membrane and containing damaged mitochondria. Bar 2 nm

они имеют округлую форму, электронно-прозрачный матрикс и лизированные кристы (рис. 5б). Поврежденные митохондрии обнаружены как в фаголизосомах (рис. 5б), так и в аутофасосомах (митосомах) (рис. 5з).

### Обсуждение

При электронно-микроскопическом и иммуноцитохимическом исследовании клеток семенных канальцев половозрелых крыс с экспериментально смоделированным МС выявлена активация процессов фагоцитоза, митофагии и аутофагии в клетках Сертоли, а также процесса аутофагии в первичных сперматоцитах, округлых и вытянутых сперматидях. После терапии МВ и ЭМИ СВЧ животных в условиях развития МС наблюдается еще большая активация этих процессов.

Аутофагия – это путь выживания клеток путем очистки от клеточных компонентов, поврежденных окислительным стрессом, перегрузки липидами. Аутофагия характеризуется образованием изолированных мембранами структур, которые охватывают область аутофасосом. Аутофасосомы сливаются с лизосомами, формируя фаголизосомы, содержимое которых переваривается лизосомальными ферментами [23]. Ауто-

фагическая элиминация поврежденных митохондрий (митофагия) является механизмом выживания при воздействии на клетки различных повреждающих агентов [24]. Поскольку клетки Сертоли играют центральную роль в выживании половых клеток, их гибель может привести к заметной утрате половых клеток и бесплодию [25]. Эффективность реакций аутофагии и митофагии помогает выживанию клеток Сертоли в условиях действия повреждающих факторов [26], обуславливая их устойчивость.

В настоящем исследовании выявлены значительные изменения митохондрий после действия ЭМИ СВЧ, которые выражались в просветлении матрикса и изменении формы митохондрий и разрушении крист. Возможно, этим объясняется активация аутофагии и митофагии после терапии. В то же время, как показано нами при изучении репаративных процессов в печени крыс с МС, при действии МВ и ЭМИ СВЧ в митохондриях гепатоцитов наблюдали, напротив, уплотнение матрикса и, следовательно, возрастание их биоэнергетического потенциала [27]. По-видимому, требуются различные режимы применения ЭМИ СВЧ для гепатоцитов и более чувствительной тестикулярной

ткани, что следует учитывать, разрабатывая методики физиотерапии.

Доказательства того, что именно первичные сперматоциты подвергаются деградации, а их фрагменты фагоцитируются клетками Сертоли, получены нами при иммуноокрашивании препаратов давленных клеток семенных канальцев. В таких препаратах в цитоплазме клеток Сертоли среди цитоплазматических филаментов, окрашенных антителами к виментину, отчетливо видны фагосомы, содержимое которых окрашивается антителами к белку SCP3 — основному белку осевых элементов мейотических хромосом и латеральных элементов сформированных СК. Дегенерация части первичных сперматоцитов на стадии пахитены хорошо объясняется тем, что в 39 % распластанных ядер первичных сперматоцитов выявляется ассоциация половых бивалентов с аутосомами и нарушение формирования структуры полового тельца. Известно, что это нарушение является маркером пахитенного ареста сперматоцитов. В результате ареста на стадии пахитены их дифференцировка прекращается и они вступают в апоптоз [28, 29]. Большое количество фаголизосом, содержащих клеточный детрит, скорее всего апоптотических клеток, подтверждает результаты иммунохимического окрашивания.

Достаточно критичным для продолжения дифференцировки сперматоцитов считается и нарушение архитектоники пахитенных ядер. Следует подчеркнуть, что в ядрах сперматоцитов наблюдалось формирование крупных включений разнообразной формы, в том числе кольцевых структур. Такие структуры окрашивались антителами к белку SCP3. У самцов 1-й (контрольной) группы такие структуры не выявлялись. Ассоциации полового бивалента с аутосомами встречались в 16 % пахитенных ядер. У крыс с МС ассоциация аутосом с XY-бивалентами обнаружена чаще — в 40–50 % ядер. У самцов с МС после терапии МВ + ЭМИ СВЧ крупные включения имели вид неправильных многоугольников, а количество кольцеобразных структур в ядрах сперматоцитов значительно возросло. Природа этих нарушений остается неясной. Следует подчеркнуть, что в ядрах клеток животных 3-й группы встречались фрагменты СК, что может приводить к формированию неполноценных половых клеток.

При этом у животных всех групп в ядрах сперматогониев и ранних сперматоцитов на стадиях лептотени-зиготены никаких нарушений обнаружить не удалось.

Иными словами, обновление пула сперматогенных клеток поддерживается у животных всех групп. Более того, по данным светомикроскопического исследования, количество ИСК у самцов 2-й и 3-й групп сохранялось на высоком уровне, а у самцов 3-й группы было больше, чем у животных 2-й группы и даже 1-й группы.

Естественно, возникает вопрос о механизмах, обеспечивающих парадоксально высокую сохранность сперматогенеза у животных с наиболее выраженными на стадии пахитены профазы I мейоза нарушениями. На основании полученных результатов мы вынуждены ограничиться предположением о том, что сохранение высокого индекса сперматогенеза может быть связано с высокой активностью аутофагии как в клетках Сертоли, так и в диплоидных и гаплоидных клетках сперматогенного ряда. Причем признаки аутофагии были наиболее ярко выражены в клетках Сертоли, сперматоцитах и сперматидеях именно у животных 3-й группы. В научной литературе имеются данные о высокой токсичности насыщенных жирных кислот для клеток Сертоли и активации в них программы апоптоза при экспериментально вызванном ожирении [30]. Аутофагия — это процесс переработки собственных компонентов клетки, поврежденных органелл, долгоживущих белков в аутофагосомах. Причем аутофагия может запускаться как компенсаторный механизм, поставляющий питание клетке из эндогенных источников, так и как механизм самоликвидации или выживания клетки в стрессовых условиях. В нормальной клетке с помощью аутофагии осуществляется обновление органелл.

Активация аутофагии в клетках Сертоли и сперматоцитах в ответ на действие самых разных повреждающих факторов описано на экспериментальных моделях [31].

### Заключение

Активация аутофагии может быть важной частью обеспечения жизнеспособности клеток Сертоли и поддержки жизнеспособности половых клеток в стрессовых ситуациях, в том числе и при МС. По-видимому, аутофагия является адаптивным механизмом, обеспечивающим удаление остатков апоптотических сперматогенных клеток, подвергшихся селекции в результате развития МС. Возможно, именно активация апоптоза и аутофагии, выявленная нами, объясняет данные других авторов, сообщивших о снижении количества сперматозоидов в эпидидимисах крыс и мышей при моделировании МС [1, 9].

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gómez-Eliás M.D., Rainero Cáceres T.S., Giaccagli M.M. et al. Association between high-fat diet feeding and male fertility in high reproductive performance

mice. *Sci Rep* 2019;9(1):18546. DOI: 10.1038/s41598-019-54799-3.

2. Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkeback N.E. Evidence

for decreasing quality of semen during past 50 years.

*Br Med J* 1992;305:609–13.

DOI: 10.1136/bmj.305.6854.609.

3. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2001;22(2):226–39. DOI: 10.1210/edrv.22.2.0425.
4. Епанчинцева Е.А., Селятицкая В.Г., Свиридова М.А., Лутов Ю.В. Медико-социальные факторы риска бесплодия у мужчин. *Андрология и генитальная хирургия* 2016;17(3):47–53. DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-47-53. [Epanchintseva E.A., Selyatitskaya V.G., Sviridova M.A., Lutov Yu.V. Sociomedical risk factors for male infertility. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2016; 17(3):47–53. (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-47-53.
5. Campbell J.M., Lane M., Owens J.A., Bakos H.W. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015;31(5):593–604. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.07.012.
6. Belloc S., Cohen-Bacrie M., Amar E. et al. High body mass index has a deleterious effect on semen parameters except morphology: results from a large cohort study. *Fertil Steril* 2014;102(5):1268–73. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1212.
7. Davidson L.M., Millar K., Jones C. et al. Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Hum Fertil (Camb)* 2015;18(3):184–93. DOI: 10.3109/14647273.2015.1070438.
8. MacDonald A.A., Herbison G.P., Showell M., Farquhar C.M. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod* 2010;16(3):293–311. DOI: 10.1093/humupd/dmp047.
9. Viguera-Villaseñor R.M., Rojas-Castañeda J.C., Chávez-Saldaña M. et al. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem* 2011;113(2):214–20. DOI: 10.1016/j.acthis.2009.10.004.
10. Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Fernandez-Capetillo O. et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Genetics* 2005;37(1):41–7. DOI: 10.1038/ng1484.
11. Kolomiets O.L., Atsaeva M.M., Dadashev S.Ya. et al. Damage to synaptonemal complex structure and peculiarities of selection of mouse spermatocytes I at response to drug administration. *Russian Journal of Genetics* 2013;49(11):1098–106. DOI: 10.1134/S1022795413110100.
12. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс — индикатор мейоза и изменчивости хромосом. М., 2007. 358 с. [Bogdanov Yu.F., Kolomiets O.L. Synaptonemal complex as indicator of chromosome variability. Moscow, 2007. 358 p. (In Russ.).]
13. Королев Ю.Н., Никулина Л.А., Гениатулина М.С. и др. Профилактика ранних постстрессорных нарушений в семенниках крыс при применении питьевой сульфатной минеральной воды в сочетании с цинком и кремнием. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры* 2011;(5):33–5. [Korolev Yu.N., Nikulina L.A., Geniatulina M.S. et al. Prevention of early post-stress disorders in rat testicles under effect of drinking sulfate mineral water containing zinc and silicium. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury = Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy* 2011;(5):33–5. (In Russ.).]
14. Королев Ю.Н., Курило Л.Ф., Гениатулина М.С. и др. Пострадиационные нарушения в семенниках крыс и их профилактика при применении питьевой сульфатной минеральной воды. *Проблемы репродукции* 2003;9(6):16–9. [Korolev Yu.N., Kurilo L.F., Geniatulina M.S. et al. Post-radiation disorders in the testes of rats and their prevention when using drinking sulphate mineral water. *Problemy reproduksii = Problems of Reproduction* 2003;9(6):16–9. (In Russ.).]
15. Королев Ю.Н., Гениатулина М.С., Никулина Л.А., Михайлик Л.В. Ультраструктурные проявления регенеративных процессов в клетках Сертולי при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях стресса у крыс. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры* 2015;92(3):40–4. [Korolev Yu.N., Geniatulina M.S., Nikulina L.A., Mikhailik L.V. 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. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury = Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy* 2015;92(3):40–4. (In Russ.).]
16. Королев Ю.Н., Никулина Л.А., Михайлик Л.В. Метаболические и ультраструктурные механизмы адаптации при первично-профилактическом действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях нормы и радиации. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры* 2019;(5):44–50. [Korolev Yu.N., Nikulina L.A., Mikhailik L.V. Metabolic and ultrastructural adaptation mechanisms during the primary prophylactic action of low-intensity electromagnetic radiation under normal and radiation conditions. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury = Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy* 2019;(5):44–50. (In Russ.).]
17. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1983;84(3):66–72. [Ukhov Yu.I., Astrakhtantsev A.F. Morphometric methods in assessing the functional state of the testes. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii = Archive of Anatomy, Histology and Embryology* 1983;84(3):66–72. (In Russ.).]
18. Navarro J., Vidal F., Guitart M., Egozcue J. A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy. *Hum Genet* 1981;59(4):419–21. DOI: 10.1007/BF00295483.
19. Kolomiets O.L., Matveevsky S.N., Bakloushinskaya I.Y. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in the Northern mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas, 1770) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females. *Comp Cytogenet* 2010;4(1):55–66. DOI: 10.3897/compcytogen.v4i1.25.
20. Page J., Suja J.A., Santos J.L., Rufas J.S. Squash procedure for protein immunolocalization in meiotic cells. *Chromosome Res* 1998;6(8):639–42. DOI: 10.1023/a:1009209628300.
21. Moens P.B., Earnshaw W.C. Anti-topoisomerase II recognizes meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 1989;98(5):317–22. DOI: 10.1007/BF00292383.
22. Kerr J.B. Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *J Electron Microscop Tech* 1991;19(2):215–40. DOI: 10.1002/jemt.1060190208.
23. Kroemer G., Marino G., Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40(2):280–93. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
24. Eid N., Ito Y., Horibe A., Hamaoka H., Kondo Y.A. Method for *in vivo* induction and ultrastructural detection of mitophagy in Sertoli cells. *Methods Mol Biol* 2018;1748:103–12. DOI: 10.1007/978-1-4939-7698-0\_9.
25. Oliveira P.F., Martins A.D., Moreira A.C. et al. The Warburg effect revisited — lesson from the Sertoli cell. *Med Res Rev* 2015; 35(1):126–51. DOI: 10.1002/med.21325.
26. Bao Z.Q., Liao T.T., Yang W.R. et al. Heat stress-induced autophagy promotes lactate secretion in cultured immature boar Sertoli cells by inhibiting apoptosis and driving SLC2A3, LDHA, and SLC16A1 expression. *Theriogenology* 2017;87:339–48. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.016.
27. Королев Ю.Н., Никулина Л.А., Михайлик Л.В. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на семенники крыс при метаболическом синдроме. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры* 2020;97(6-2):59–60. [Korolev Yu.N., Bragina E.E., Nikulina L.A., Mikhailik L.V. Feature of action of low-intensive electromagnetic radiation



- under the development of metabolic syndrome (experimental study). *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury* = Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy 2020;97(6-2):59–60. (In Russ.)].
28. Homolka D., Jansa P., Forejt J. Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure. *Chromosoma* 2012;121(1):91–104. DOI: 10.1007/s00412-011-0346-5.
29. Turner J., Mahadevaiah S., Fernandez-Capetillo O. et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Genetics* 2005;37(1):41–7. DOI: 10.1038/ng1484.
30. Hu X., Ge X., Liang W. et al. Effects of saturated palmitic acid and omega-3 polyunsaturated fatty acids on Sertoli cell apoptosis. *Syst Biol Reprod Med* 2018;64(5):368–80. DOI: 10.1080/19396368.2018.1471554.
31. Horibe A., Eid N., Ito Y., Otsuki Y., Kondo Y. Ethanol-induced autophagy in Sertoli cells is specifically marked at androgen-dependent stages of the spermatogenic cycle: potential mechanisms and implications. *Int J Mol Sci* 2019;20(1):184. DOI: 10.3390/ijms20010184.

#### Вклад авторов

О.Л. Коломиец: разработка дизайна иммуноцитохимического исследования тестикулярной ткани, анализ полученных результатов, обзор литературы по теме исследования, написание текста статьи;  
Е.Е. Брагина: разработка дизайна электронно-микроскопического исследования клеток тестикулярной ткани, анализ полученных результатов, обзор литературы по теме исследования, написание текста статьи;  
А.А. Кашинцова: иммуноцитохимическое исследование клеток тестикулярной ткани, анализ полученных результатов и данных литературы, написание текста статьи;  
В.Е. Спангенберг: иммуноцитохимическое исследование и анализ полученных результатов;  
Л.А. Никулина: проведение эксперимента по моделированию метаболического синдрома на животных, разработка дизайна и проведение гистологического исследования, статистический анализ данных;  
Л.В. Михайлик: проведение эксперимента по моделированию метаболического синдрома на животных, обзор литературы по теме исследования, написание текста статьи;  
Ю.Н. Королев: разработка дизайна исследования, проведение эксперимента по моделированию метаболического синдрома на животных, написание текста статьи.

#### Authors' contributions

O.L. Kolomiets: developing the design of an immunocytochemical examination of testicular tissue, analysis of the results, reviewing of the literature on the article's theme, article writing;  
E.E. Bragina: developing the design of electron microscopic examination of testicular cells, analysis of the results, reviewing of the literature the article's theme, article writing;  
A.A. Kashintsova: immunocytochemical examination of testicular cells, analysis of the results and literature data, article writing;  
V.E. Spangenberg: immunocytochemical examination and analysis of the results;  
L.A. Nikulina: conducting an experiment on modeling the metabolic syndrome in animals, developing the design and conducting a histological examination, statistical analysis;  
L.V. Mikhailik: conducting an experiment on modeling the metabolic syndrome in animals, reviewing the literature on the topic of the study, article writing;  
Yu.N. Korolev: developing the study design, conducting an experiment on modeling the metabolic syndrome in animals, article writing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

О.Л. Коломиец / O.L. Kolomiets: <https://orcid.org/0000-0002-1915-0039>  
Е.Е. Брагина / E.E. Bragina: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>  
А.А. Кашинцова / A.A. Kashintsova: <https://orcid.org/0000-0001-9715-381X>  
В.Е. Спангенберг / V.E. Spangenberg: <https://orcid.org/0000-0002-6623-9124>  
Л.А. Никулина / L.A. Nikulina: <https://orcid.org/0000-0003-2200-868X>  
Л.В. Михайлик / L.V. Mikhailik: <https://orcid.org/0000-0002-9717-4749>  
Ю.Н. Королев / Yu.N. Korolev: <https://orcid.org/0000-0001-5530-1538>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование частично выполнено в рамках госзадания № 0112-2019-0002 Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, за счет средств гранта РФФИ № 17-00-00429 КОМФИ, программы развития Московского государственного университета 5.13.

**Funding.** The study was partially funded within the framework of State task No. 0112-2019-0002 of the N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences of the Russian Academy of Sciences, at the expense of the RFFR grant No. 17-00-00429 of the COMFI, the development program of Moscow State University 5.13.

#### Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

#### Compliance with principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

**Статья поступила:** 22.11.2020. **Принята к публикации:** 29.12.2020.

**Article submitted:** 22.11.2020. **Accepted for publication:** 29.12.2020.