The subcutaneous adipose tissue taken from the interscapular region of the foetus consists of brown adipocytes with a nucleus located in the centre of the cytoplasm and surrounded by numerous fat droplets. Brown adipocytes when compared with white adipocytes are smaller and rounded in shape. Brown adipose tissue predominates in women than in men. Brown adipose tissue is not active all the time, but only at low ambient temperatures. In women, brown adipocytes are more saturated with mitochondria than in men. Adipose tissue of a human omentum can be a source of graft implant for restoring abdominal organ defects during extensive surgical operations.

DOI 10.31718/2077-1096.20.2.175

УДК 612.018:611.631:599.323.4:546.17

Стецук Е.В., Акимов О.Е., Мищенко А.В.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА В РАЗВИТИИ ФИБРОЗА В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ДЕПРИВАЦИИ СИНТЕЗА ТЕСТОСТЕРОНА

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава.

Рак простаты является вторым наиболее частым диагнозом в онкологии и занимает пятое место среди причин смертности у мужчин по всему миру. В 2018 году было зафиксировано 1,276,106 случаев впервые выявленного рака простаты. Андрогены играют большую роль в развитии рака простаты. Элиминация андрогенов и блокада их синтеза являются ключевыми патогенетическими этапами в лечении рака простаты. Метаболические и морфологические изменения в семенниках в условиях длительной центральной депривации синтеза тестостерона на данный момент изучены недостаточно. Целью данного исследования было установление роли активных форм кислорода и азота в развитии морфологических изменений в семенниках крыс в условиях длительной центральной депривации синтеза тестостерона. Материалы и методы. Опыты были проведены на 20 половозрелых белых крысах - самцах линии «Вистар». Животные были разделены на 4 группы по 5 животных. Первая группа (контрольная) получала подкожно инъекцию хлорида натрия 0,9% на протяжении 180 дней. Вторая группа получала подкожно инъекцию диферелина (трипторелина) в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 30 дней с целью моделирования центральной депривации синтеза тестостерона. В третьей группе вводили диферелин в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 90 дней. Четвертая группа получала подкожно инъекцию диферелина в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 180 дней. Маленькие кусочки семенников фиксировали и заключали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты изучали с помощью светового микроскопа с цифровой микрофотонасадкой фирмы Olympus C 3040-ADU с адаптированными для данных исследований программами. В 10% гомогенате семенников определяли общую активность NO-синтазы (gNOS), активность индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS) и конститутивных изоформ (cNOS), а также продукцию супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$). Результаты. Длительная центральная депривация синтеза тестостерона приводит к нарастающему увеличению интерстициального пространства семенников с развитием фиброзных изменений на 180 день эксперимента. Стенка канальцев уплотнена, отека, с наружи определяется большое количество пристеночных макрофагов в сравнении с предыдущими сроками эксперимента (30 и 90 дней). В структуре некоторых извитых семенных канальцев сначала происходила дисконфлексация и дезориентация, а в дальнейшем - десквамация сперматид. Уменьшалось число сперматогоний типа А и В. В ядрах отмечалась гипохромия и пикноз. Активности gNOS и iNOS нарастают до 90-го дня и снижаются на 180 при сравнении с 90 днём, оставаясь выше активностей контрольной группы. Активность cNOS понижена во всех экспериментальных группах. Продукция $O_2^{\cdot-}$ повышена во всех экспериментальных группах. Вывод: увеличение продукции оксида азота индуцибельной изоформой NO-синтазы приводит к деструктивным изменениям в семенниках крыс с последующим развитием фиброзных изменений на 180-е сутки центральной депривации синтеза тестостерона путём усиления продукции супероксидного анион-радикала.

Ключевые слова: оксид азота, активные формы кислорода, семенники, крысы, тестостерон

Работа является частью инициативной научно-исследовательской работы: «Экспериментально-морфологическое изучение действия криоконсервированных препаратов кордовой крови и эмбриофетоплацентарного комплекса, диферелина, этанола и 1% эфира метакриловой кислоты на морфофункциональное состояние ряда внутренних органов» (№ госрегистрации 0119U102925)

Рак простаты является вторым наиболее частым диагнозом в онкологии и занимает пятое место среди причин смертности у мужчин по всему миру [1]. В 2018 году было зафиксировано 1,276,106 случаев впервые выявленного рака

простаты [1].

Андрогены играют большую роль в развитии рака простаты. Элиминация андрогенов и блокада их синтеза являются ключевыми патогенетическими этапами в лечении рака простаты [2].

Перспективным препаратом для лечения рака простаты путём блокады синтеза тестостерона является диферелин (трипторелин). Диферелин позволяет снизить интенсивность синтеза тестостерона до уровня, достигаемого хирургической кастрацией [3].

Не решенной на данный момент проблемой является стойкое выпадение половой функции после успешной терапии рака простаты диферелином. Метаболические и морфологические изменения в семенниках в условиях длительной центральной депривации синтеза тестостерона на данный момент изучены недостаточно.

Цель исследования

Установление роли активных форм кислорода и азота в развитии морфологических изменений в семенниках крыс в условиях длительной центральной депривации синтеза тестостерона.

Материалы и методы исследования

Опыты были проведены на 20 половозрелых белых крысах - самцах линии «Вистар». Животные были разделены на 4 группы по 5 животных. Первая группа (контрольная) получала подкожно инъекцию хлорида натрия 0,9% на протяжении 180 дней. Вторая группа получала подкожно инъекцию диферелина (трипторелина) в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 30 дней с целью моделирования центральной депривации синтеза тестостерона [4]. В третьей группе вводили диферелин в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 90 дней. Четвертая группа получала подкожно инъекцию диферелина в дозе 0,3 мг/кг действующего вещества на протяжении 180 дней.

Животные содержались в стандартных условиях вивария Украинской медицинской стоматологической академии. Подопытных животных подвергали эвтаназии в строгом соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986), а также «Общих этических принципов экспериментов на животных» принятых первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

После передозировки кетаминем животных декапитировали, отпрепарированные маленькие кусочки семенников фиксировали и заключали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистологические препараты изучали с помощью светового микроскопа с цифровой микрофотонасадкой фирмы Olympus C 3040-ADU с адаптированными для данных исследований программами (Olympus DP - Soft, лицензия № VJ285302, VT310403, 1AV4U13B26802) и Biorex 3 (серийный номер 5604).

Все биохимические исследования проводились в 10% гомогенате тканей семенников с ис-

пользованием спектрофотометра Ulab 101.

Общую активность NO-синтаз (gNOS) определяли по приросту нитритов после инкубации в трис-буферном растворе (pH=7,4) содержащем субстрат реакции и донор электронов (НАДФН-восстановленный). Активность конститутивных форм (cNOS) и индуцибельной (iNOS) определяли с помощью селективного ингибитора iNOS – аминогуанидина гидрохлорида (Sigma Aldrich). Концентрацию нитритов (NO_2^-) определяли с помощью реактива Грисса-Илосвая на длине волны 540 нм [5].

Базовую продукцию супероксидного анион-радикала ($\text{O}_2^{\cdot -}$) определяли по приросту диформазана, образованного в реакции $\text{O}_2^{\cdot -}$ с нитросиним тетразолием после инкубации в буферном растворе (pH=7,4) содержащим гидроксид натрия. Концентрацию диформазана определяли спектрофотометрически на длине волны 540 нм [5].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Excel пакета Microsoft Office и расширения к ней Real Statistics 2019. Для определения статистической значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Разницу считали статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После 30 дневной центральной депривации синтеза тестостерона в интерстициальных эндокриноцитах развиваются незначительные деструктивные нарушения в ультраструктурной организации пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи.

В интерстициальной ткани яичка определялись макрофаги, которые располагались по одиночке или группами 1-3 в поле зрения возле кровеносного сосуда. Сосуды полнокровны, внутри сосудов определяется краевое стояние лейкоцитов с элементами миграционной активности через стенку сосуда в пространство интерстициальной ткани (Рис.1).

При изучении ультраструктурной организации суспендоцитов крыс структура которых в общих чертах отвечала группе контроля. Однако, определялись суспендоциты, в цитоплазме которых наблюдалась гиперплазия элементов гладкой эндоплазматической сети, морфологическим эквивалентом которой являются многочисленные мелкие и расширенные везикулы округлой формы, локализовались преимущественно в апикальных отделах клеток.

Также в этих фрагментах суспендоцитов оказывались головки созревающих сперматид с нарушением структур тубуло-бульбарного комплекса с первичными признаками дегенерации. В цитоплазме суспендоцитов оказывались достаточно много фагосом, содержащих фрагменты погибших клеток. Межклеточные контакты между круглыми сперматидами и суспендоцитами

были не нарушены, но в цитоплазме некоторых сперматоцитов, круглых и созревающих сперматид появлялась деформация внутренних мембран и вакуолизация митохондрий.

В цитоплазме сустентоцитов уменьшается количество митохондрий, электронная плотность митохондриального матрикса снижается. В цитоплазме вакуолизированных сустентоцитов встречаются ультраструктурные признаки незначительной деградации мембранных структур цитоплазмы в виде концентрических электронно-плотных образований, присутствовали структуры белка, которые находились или внутри вакуолей, либо самостоятельно располагаются в цитоплазме клеток. Количество липидных капель в базальной цитоплазме сустентоцитов была увеличенной по сравнению с контрольной

группой.

После 90-дневной центральной депривации синтеза тестостерона нами было установлено, что интерстициальное пространство семенников было увеличено в сравнении с контрольной группой животных и предыдущим этапом эксперимента (30-е сутки) (Рис.2). Сосуды полнокровны, внутри сосудов определяется краевое стояние лейкоцитов. Вокруг кровеносных сосудов определяются группы интерстициальных эндокриноцитов по 1-3 клетки в поле зрения (в контрольной группе 3-5). Интерстициальные эндокриноциты имели ядра округлой или овальной формы, четко выделялись 1-2 ядрышка. Характерным признаком было наличие в цитоплазме различных по величине и электронной плотности секреторных гранул.

Рис. 1. Извитые семенные канальцы на 30 день эксперимента при центральной депривации тестостерона. Полутонкий срез. Окр. Гематоксилин –эозин. Ув. 300: 1. Интерстициальное пространство. 2. Просвет извитого семенного канальца. 3. Сперматогенный эпителий.

Рис. 2. Извитые семенные канальцы и интерстициальное пространство на 90 день эксперимента при центральной депривации тестостерона. Ультратонкий срез. Окр. Метиленовый синий. Ув. 600. 1. Макрофаг интерстициальный. 2. Макрофаг пристеночный. 3. Просвет капилляра с краевым стоянием лейкоцитов 4. Интерстициальный эндокриноцит. 5. Вакуолизация сперматогенного эпителия

Рис. 3. Фиброз интерстициального пространства семенников. Извитые семенные канальцы на 180 день эксперимента при центральной депривации тестостерона. Полутонкий срез. Окр. Гематоксилин –эозин. Ув. 100: 1. Интерстициальное пространство - фиброз. 2. Извитой семенной каналец с единичными сустентоцитами. 3. Сперматогенный эпителий неслющенного канальца. 4. Интерстициальные клетки. 5. Капилляр в интерстиции с фибробластами

Стенка извитых семенных канальцев уплотнена, отечна, с наружи определяется большое количество пристеночных макрофагов в сравнении с контрольной группой животных. В просвете извитых канальцев определялось две популяции клеток – это были сустентоциты и клетки сперматогенного ряда на разных этапах дифференцировки.

Визуализировались сустентоциты, в цитоплазме которых наблюдалась гиперплазия элементов гладкой эндоплазматической сети, морфологическим эквивалентом которой являются многочисленные мелкие и крупно расширенные везикулы округлой формы, локализовались преимущественно в апикальных отделах клеток. Также в этих фрагментах сустентоцитов оказывались головки созревающих сперматид с нарушением структур тубуло-бульбарного комплекса и первичными признаками дегенерации.

В структуре извитых семенных канальцев обнаруживается увеличение высоты сперматогенного слоя. Отмечалось наличие малых и средних вакуолей, имеющих тенденцию к увеличению и слияния в зоне контакта между сперматогониями и базальной мембраны извитых семенных канальцев. В единичных извитых семенных канальцах сначала происходила дисконкомплексация и дезориентация, а в дальнейшем - десквамация сперматид. Уменьшался объем их цитоплазмы в сравнении с контрольной группой. За счет полного или частичного слущивания клеток сперматогенного слоя от базальной мембраны в просвете канальцев образовывались так называемые «семенные шары».

После 180-дневной центральной депривации синтеза тестостерона нами было установлено, что интерстициальное пространство семенников было увеличено в сравнении с контрольной группой животных и предыдущими этапами эксперимента (30-е и 90-е сутки), появляются признаки фиброза (Рис.3). Сосуды полнокровны. Вокруг кровеносных сосудов определяются группы макрофагов и интерстициальных эндокриноцитов. Макрофаги находились в фазе фагоцитоза (Рис.3).

Стенка канальцев уплотнена, отечна, с наружи определяется большое количество пристеночных макрофагов в сравнении с предыдущими сроками эксперимента. В структуре некоторых извитых семенных канальцев сначала происходила дисконкомплексация и дезориентация, а в дальнейшем - десквамация сперматид. Уменьшалось число сперматогоний типа А и В. В ядрах отмечалась гипохромия и пикноз. Происходила также дезориентация, дисконкомплексация сперматоцитов II, затем I порядка, а иногда и их десквамация. За счет полного или частичного слущивания клеток сперматогенного слоя от базальной мембраны в просвете канальцев визуализировались «семенные шары» (Рис.3).

Общая активность NOS после 30 дневной центральной блокады синтеза тестостерона не увеличилась по сравнению с контрольной группой, однако произошла смена источника продукции оксида азота с конститутивных форм NOS на индуцибельную (Рис. 4).

Рис.4. Активность NO-синтаз в семенниках крыс на разных сроках центральной депривации синтеза тестостерона.

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от контрольной группы; ** - данные статистически значимо отличаются от предыдущего срока.

Рис.5. Продукция $O_2^{\bullet-}$ в семенниках крыс на разных сроках центральной депривации синтеза тестостерона.

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от контрольной группы; ** - данные статистически значимо отличаются от предыдущего срока.

Продукция супероксидного анион-радикала значительно увеличивается на 30-й день центральной депривации синтеза тестостерона (Рис. 5).

На 90-й день центральной депривации синтеза тестостерона активность cNOS остается сниженной при сравнении с контрольной группой и статистически значимо не изменяется при сравнении с 30-м днём. В то же время общая активность NOS продолжает увеличиваться за счёт увеличения активности iNOS. Продукция $O_2^{\bullet-}$ также продолжает расти.

Гиперпродукция активных форм азота и кислорода может приводить к развитию оксидативно-нитрозативного стресса, что объясняет наблюдаемые нами на 90-е сутки гистологические изменения в виде увеличения интерстициального пространства, дисконфлексии, дезориентации, а в дальнейшем и десквамации сперматид с формированием «семенных шаров».

На 180-е сутки эксперимента общая активность NOS и активность iNOS снижаются при сравнении с 90-ми сутками, но остаются повышенными при сравнении с контрольной группой. Активность cNOS снижается при сравнении с 90-ми сутками. Продукция $O_2^{\bullet-}$ снижается при сравнении с 90-ми сутками, но остается высокой при сравнении с контрольной группой.

Снижение продукции активных форм кислорода и азота на 180-е сутки экспериментальной центральной депривации синтеза тестостерона является следствием частичного замещения паренхимы семенников соединительной тканью.

Тестостерон тесно связан с продукцией оксида азота конститутивными изоформами (в частности, эндотелиальной) NOS, чем объясняется стойкое снижение активности cNOS на протяжении всего эксперимента [6]. Интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига) не спо-

собны взять на себя функцию по контролю продукции тестостерона без центрального регулятора, который в условиях эксперимента отключен диферелином. Также в клетках Лейдига отмечались деструктивные изменения, которые могли быть следствием оксидативно-нитрозативного повреждения.

Повышенная активность iNOS является частой причиной мужского бесплодия и нарушений сперматогенеза [7]. Повышенная активность iNOS, наблюдаемая в наших исследованиях приводит формированию «семенных шаров» и нарушению сперматогенеза на 90-й и 180-й день центральной депривации синтеза тестостерона.

Смена источника продукции оксида азота в семенниках на 30-й день эксперимента с cNOS на iNOS может быть следствием смены поляризации резидентных интерстициальных макрофагов семенников с противовоспалительной (M2) на провоспалительную (M1). Изменения поляризации интерстициальных макрофагов семенников с M2 на M1 приводит к усугублению дефицита тестостерона [8]. Свидетельством преобладания M1 поляризации в условиях центральной депривации синтеза тестостерона является стойкое увеличение активности iNOS на протяжении всего эксперимента. Повышение активности iNOS также может вызывать развитие апоптоза в клетках Лейдига, что объясняет уменьшение их количества в поле зрения на 90-е и 180-е сутки [8].

Активация транскрипционного фактора NF-κB может быть причиной увеличения активности iNOS в семенниках и приводить к развитию фиброзных изменений на 180-е сутки эксперимента [9]. Увеличение продукции супероксидного анион-радикала в семенниках крыс также является следствием повышенной активности iNOS [10].

Выводы

Увеличение продукции оксида азота индуцибельной изоформой NO-синтазы приводит к деструктивным изменениям в семенниках крыс с последующим развитием фиброзных изменений на 180-е сутки центральной депривации синтеза тестостерона путём усиления продукции супероксидного анион-радикала

Литература

1. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019; 10(2): 63-89. doi: 10.14740/wjon1191.
2. Rice MA, Malhotra SV, Stoyanova T. Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2019; 9: 801. doi: 10.3389/fonc.2019.00801.
3. Merseburger AS, Hupe MC. An Update on Triptorelin: Current Thinking on Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Adv Ther.* 2016; 33(7): 1072-93. doi: 10.1007/s12325-016-0351-4.
4. Botté MC, Lerrant Y, Lozach A, Bérault A, Counis R, Kottler ML. LH down-regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor, but not GnRH, mRNA levels in the rat testis. *J Endocrinol.* 1999; 162(3): 409-15.
5. Yelins'ka AM, Akimov OYe, Kostenko VO. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91(1): 80-85. doi: 10.15407/ubj91.01.080.
6. Hotta Y, Kataoka T, Kimura K. Testosterone Deficiency and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide, Asymmetric Dimethylarginine, and Endothelial Progenitor Cells. *Sex Med Rev.* 2019; 7(4): 661-668. doi: 10.1016/j.sxmr.2019.02.005.
7. Sohrabi M, Hosseini M, Inan S, Alizadeh Z, Vahabian M, Vahidinia AA et al. Effect of Antioxidants on Testicular iNOS and eNOS after High-Fat Diet in Rat. *Pak J Biol Sci.* 2017;20(6):289-297. doi: 10.3923/pjbs.2017.289.297.
8. Zhou PH, Hu W, Zhang XB, Wang W, Zhang LJ. Protective Effect of Adrenomedullin on Rat Leydig Cells from Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Apoptosis via the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 7201549. doi: 10.1155/2016/7201549.
9. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod.* 2009 Jul;24(7):1717-25. doi: 10.1093/humrep/dep058.
10. Boonprom P, Boonla O, Chayaburakul K, Welbat JU, Pannangpetch P, Kukongviriyapan U et al. Garcinia mangostana pericarp extract protects against oxidative stress and cardiovascular remodeling via suppression of p47phox and iNOS in nitric oxide deficient rats. *Ann Anat.* 2017; 212: 27-36. doi: 10.1016/j.aanat.2017.03.007.

Реферат

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА АЗОТУ В РОЗВИТКУ ФІБРОЗУ У СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ СИНТЕЗУ ТЕСТОСТЕРОНУ

Стецюк С.В., Акімов О.Є., Міщенко А.В.

Ключові слова: оксид азоту, активні форми кисню, сім'яники, щури, тестостерон

Рак простати є другим найбільш частим діагнозом в онкології і займає п'яте місце серед причин смертності у чоловіків по всьому світу. У 2018 році було зафіксовано 1,276,106 випадків вперше виявленого раку простати. Андрогени відіграють велику роль у розвитку раку простати. Елімінація андрогенів і блокада їх синтезу є ключовими патогенетичними етапами в лікуванні раку простати. Метаболічні та морфологічні зміни в сім'яниках в умовах тривалої центральної депривації синтезу тестостерону на даний момент вивчені недостатньо. Метою даного дослідження було встановлення ролі активних форм кисню та азоту в розвитку морфологічних змін в сім'яниках щурів в умовах тривалої центральної депривації синтезу тестостерону. Матеріали та методи. Досліди були проведені на 20 статевозрілих білих щурах - самцях лінії «Вістар». Тварини були розділені на 4 групи по 5 тварин. Перша група (контрольна) отримувала підшкірно ін'єкцію хлориду натрію 0,9% протягом 180 днів. Друга група отримувала підшкірно ін'єкцію дифереліну (триптореліну) в дозі 0,3 мг/кг діючої речовини протягом 30 днів з метою моделювання центральної депривації синтезу тестостерону. У третій групі вводили диферелін в дозі 0,3 мг/кг діючої речовини протягом 90 днів. Четверта група отримувала підшкірно ін'єкцію дифереліну в дозі 0,3 мг/кг діючої речовини протягом 180 днів. Маленькі шматочки сім'яників фіксували і заклали в парафінові блоки, з яких виготовляли зрізи товщиною 4 мкм і фарбували гематоксиліном та еозином. Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа з цифровою мікрофотонасадкою фірми Olympus C 3040-ADU з адаптованими для даних досліджень програмами. У 10% гомогенаті сім'яників визначали загальну активність NO-синтази (gNOS), активність індуцибельної ізоформи NO-синтази (iNOS) і конститутивних ізоформ (cNOS), а також продукцію супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\cdot-}$). Результати. Тривала центральна депривація синтезу тестостерону призводить до наростаючого збільшення інтерстиціального простору сім'яників з розвитком фіброзних змін на 180 день експерименту. Стінка каналців ущільнена, набрякла, ззовні визначається велика кількість пристінкових макрофагів в порівнянні з попередніми термінами експерименту. У структурі деяких звивистих сім'яних каналців спочатку відбувалася дисконфлексія і дезорієнтація, а в подальшому - десквамация сперматид. Зменшувалася кількість сперматогоній типу А і В. В ядрах відзначалася гіпохромія та пікноз. Активності gNOS та iNOS нарастають до 90-го дня і знижуються на 180 при порівнянні з 90 днем, залишаючись вище активностей контрольної групи. Активність cNOS знижена у всіх експериментальних групах. Продукція $O_2^{\cdot-}$ підвищена у всіх експериментальних групах. Висновок: збільшення продукції оксиду азоту індуцибельною ізоформою NO-синтази призводить до деструктивних змін в сім'яниках щурів з подальшим розвитком фіброзних змін на 180-у добу центральної депривації синтезу тестостерону шляхом посилення продукції супероксидного аніон-радикала.

Summary

ROLE OF THE REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES IN THE DEVELOPMENT OF FIBROSIS IN THE TESTES OF RATS WITH PROLONGED CENTRAL DEPRIVATION OF TESTOSTERONE SYNTHESIS

Stetsuk Ye.V., Akimov O.Ye., Mischenko A.V.

Key words: nitric oxide, reactive oxygen species, testes, rats, testosterone

Prostate cancer is the second most common diagnosis in oncology and ranks the fifth among the causes of mortality in men around the world. 1,276,106 cases of newly diagnosed prostate cancer were recorded in 2018. Androgens play a large role in the development of prostate cancer. Elimination of androgens and blockade of their synthesis are key pathogenetic steps in the treatment of prostate cancer. Metabolic and morphological changes in the testes under prolonged central deprivation of testosterone synthesis are currently not well understood. The aim of this study was to establish the role of reactive oxygen and nitrogen species in the development of morphological changes in the testes of rats under prolonged central deprivation of testosterone synthesis. Materials and methods. The experiments were conducted on 20 sexually mature male Wistar rats. Animals were divided into 4 groups of 5 animals in each. The first group (control) received a subcutaneous injection of 0.9% sodium chloride for 180 days. The second group received a subcutaneous injection of diphereline (triptoreline) in a dose of 0.3 mg/kg of active agent for 30 days in order to simulate the central deprivation of testosterone synthesis. In the third group, diphereline was administered in a dose of 0.3 mg/kg of the active agent for 90 days. The fourth group received a subcutaneous injection of diphereline in a dose of 0.3 mg/kg of the active agent for 180 days. Small pieces of testes were fixed and enclosed in paraffin blocks; then 4- μ m thick sections were made and stained with hematoxylin and eosin. Histological preparations were studied using an optical microscope with a digital microphotographic nozzle Olympus C 3040-ADU with programs adapted for these studies. The total activity of NO synthases (gNOS), the activity of the inducible isoform of NO synthase (iNOS) and constitutive isoforms (cNOS), as well as the production of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) were determined in 10% homogenate of testes. Results. Long-term central deprivation of testosterone synthesis leads to an increase in the interstitial space volume with the development of fibrotic changes in the testes on the 180th day of the experiment. The wall of seminiferous tubules was compacted, swollen, there were a large number of parietal macrophages from the outside compared to previous periods of the experiment. In the structure of some convoluted seminiferous tubules, first there was discompletion and disorientation, and then desquamation of spermatids. The number of spermatogonia type A and B decreased. Hypochromia and pycnosis were noted in the nuclei. The activities of gNOS and iNOS increased until the 90th day and decreased by 180th when compared with 90th day, remaining higher than the activities of the control group. Activity of cNOS was reduced in all experimental groups. $O_2^{\cdot-}$ production increased in all experimental groups. Conclusion: an increase in the production of nitric oxide by the inducible isoform of NO synthase leads to destructive changes in the testes of rats with the subsequent development of fibrotic changes on the 180th day of central deprivation of testosterone synthesis by enhancing the production of superoxide anion radical.