

ИЗМЕНЕНИЯ СТРОЕНИЯ ПРИДАТКОВ СЕМЕННИКОВ КРЫС РЕПРОДУКТИВНОГО ПЕРИОДА В УСЛОВИЯХ ИММУНОСУПРЕССИИ

С. А. Кащенко, А. А. Захаров

Цель исследования – оценка морфометрических особенностей придатков семенников в условиях искусственной иммуносупрессии. Исследование выполнено на 60 белых крысах репродуктивного возраста. Состояние иммуносупрессии моделировали путем применения циклофосамида в дозировке 1,5 мг/кг массы тела внутримышечно в течение 10 дней. Статистически значимое снижение органомерических параметров придатка выявлено как на ранних (7-е и 15-е сутки), так и поздних сроках наблюдения (30-е сутки), что вызвано интенсивной кумуляцией иммуносупрессивного действия. Изменения на микроскопическом уровне коррелируют со снижением макроскопических показателей, что объясняется влиянием искусственной иммуносупрессии на синтетический аппарат клеток.

Ключевые слова: циклофосамид, придаток семенника, крысы, иммуносупрессия.

ВВЕДЕНИЕ

Несоответствие между стремительными темпами техногенного преобразования окружающей среды и адаптационными резервами организма приводит к ухудшению здоровья общества и обуславливает практически повсеместно неблагоприятную демографическую ситуацию. В течение последних десятилетий во всем мире отмечено снижение фертильности мужчин, что объясняется тенденцией к увеличению заболеваний мужских половых органов. В связи с этим наблюдается ухудшение количественных и качественных показателей спермограммы у практически здоровых мужчин. Среднее количество сперматозоидов в эякуляте здорового мужчины за последние 50 лет уменьшилось вдвое, а его средний объем – на одну треть [1]. Существуют исследования, которые дают основания считать, что факторы образа жизни (воздействия окружающей среды, стресс, курение, алкоголь,

урбанизация и т. д.) отрицательно влияют на мужскую репродуктивную систему, которая оказывается весьма уязвимой и недостаточно защищенной [2]. Доказано, что вышеперечисленные влияния приводят к возникновению иммуносупрессивных состояний, прямо или опосредованно вызывающих нарушения в функционировании половой системы [3]. Однако существующие научные разработки касаются в своем большинстве клинико-биохимических и молекулярно-генетических аспектов данной проблемы, тогда как морфологические особенности изменений в структуре органов малоизучены. Особое внимание вызывают придатки семенников, выполняющие важнейшие функции депонирования и активации сперматозоидов [4]. Морфологические исследования данного органа малочисленные и несистематизированные, а опубликованные научные работы, касающиеся изменений

CHANGES IN EPIDIDYMISS STRUCTURE OF RATS OF REPRODUCTIVE PERIOD UNDER IMMUNOSUPPRESSION CONDITIONS

S. A. Kashchenko, A. A. Zakharov

The article studies morphometric features of the epididymis under conditions of artificial immunosuppression. The study was carried out on 60 white rats of reproductive age. The state of immunosuppression was modeled by the use of cyclophosphamide intramuscularly in a dose of 1.5 mg/kg body weight for 10 days. Statistically significant decrease in the organometric parameters of the epididymis was detected both at the early (7, 15 days) and late observation periods (30 days), which are caused by intensive cumulation of immunosuppressive action. Changes at a microscopic level correlate in descent of macroscopic parameters, due to the effect of artificial immunosuppression on the synthetic apparatus of cells.

Keywords: cyclophosphamide, epididymis, rats, immunosuppression.

его морфоструктуры в условиях, вызывающих супрессию иммунной системы, практически отсутствуют.

Целью работы – выявление морфометрических особенностей придатков семенников в условиях искусственной иммуносупрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 60 белых крысах репродуктивного возраста, полученных из вивария лабораторных животных ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет им. святителя Луки». Грызуны получали полноценный рацион и содержались в стандартных условиях. Состояние иммуносупрессии моделировали путем применения алкилирующего цитостатика циклофосамида в дозировке 1,5 мг/кг массы тела внутримышечно в течение 10 дней. Животные, получавшие эквивалентные объемы 0,9 % раствора хлорида натрия по той же схеме, формировали контрольную группу. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после прекращения введения иммуносупрессора. При работе с животными руководствовались Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях [5]. Придатки семенников взвешивали на торсионных весах, рассчитывали относительную массу, определяли линейные размеры с помощью штангенциркуля: длину, ширину и толщину. Объем органа устанавливали методом вытеснения воды [6–7].

Придатки семенника подвергали стандартной гистологической проводке, полученные срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и фотографировали с помощью автоматизированного морфометрического комплекса «Olympus CX-41». Микроморфометрические измерения объектов про-

водили путем загрузки полученных цифровых изображений в компьютерную программу АСКОН «Компас-3D 17.0» с калибровкой с помощью фотографий объект-микрометра в аналогичных режимах съемки. На микроскопическом уровне в придатках семенников исследовали высоту и ширину эпителиоцитов, их объем, а также больший и меньший диаметры и объем ядер клеток. Объемные показатели рассчитывали по формуле вытянутого эллипсоида вращения:

$$V = \frac{\pi AB^2}{6},$$

где V – объем ядра, A – больший диаметр, B – меньший диаметр [8].

Полученные данные обрабатывали с использованием лицензионной программы StatSoft Statistica V. 6.0. Применялись методы параметрической статистики, так как использование критерия Шапиро – Уилка позволило установить нормальное распределение показателей в выборке. Достоверность различий между показателями экспериментальных и контрольных групп определяли с помощью критерия Стьюдента – Фишера с вероятностью ошибки $p < 0,05$, допустимой для медико-биологических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Придаток семенника прилежит к дорсальному краю семенника, имеет головку, тело и хвост. Головка образована выносящими канальцами, тело и хвост представлены многочисленными извитостями протока придатка семенника, в просвете которого находится значительное количество сформированных сперматозоидов (рис. 1).

Изнутри проток выстлан двурядным эпителием, содержащим высокие реснитчатые эпителиоциты и низкие вставочные клетки.

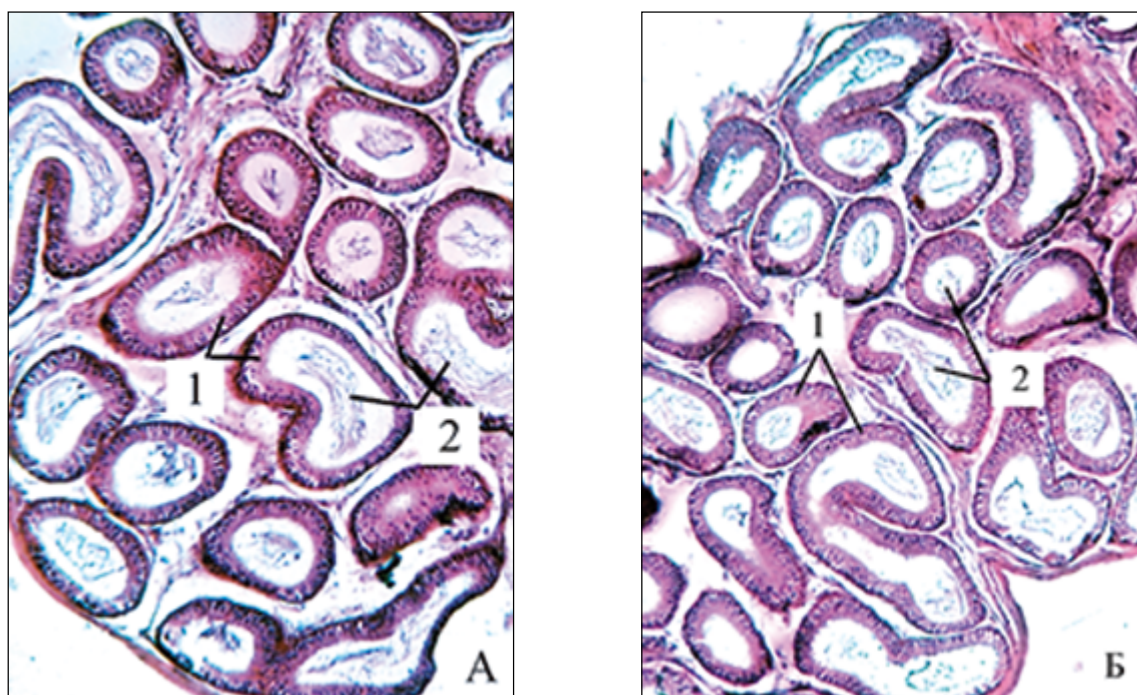


Рис. 1. Участок придатка семенника животных репродуктивного возраста на 30е сутки наблюдения:

А – после применения циклофосамида; Б – в контроле; 1 – эпителий канальцев придатка;

2 – сперматозоиды в просвете канальцев. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение: приближение: Zoot 18,5; объектив: PlanCN 10x/0.25 ∞/-/FN22

Органометрические показатели придатков семенников животных контрольных групп подвергались

прогрессивным изменениям в связи с закономерными процессами их морфогенеза (рис. 2).

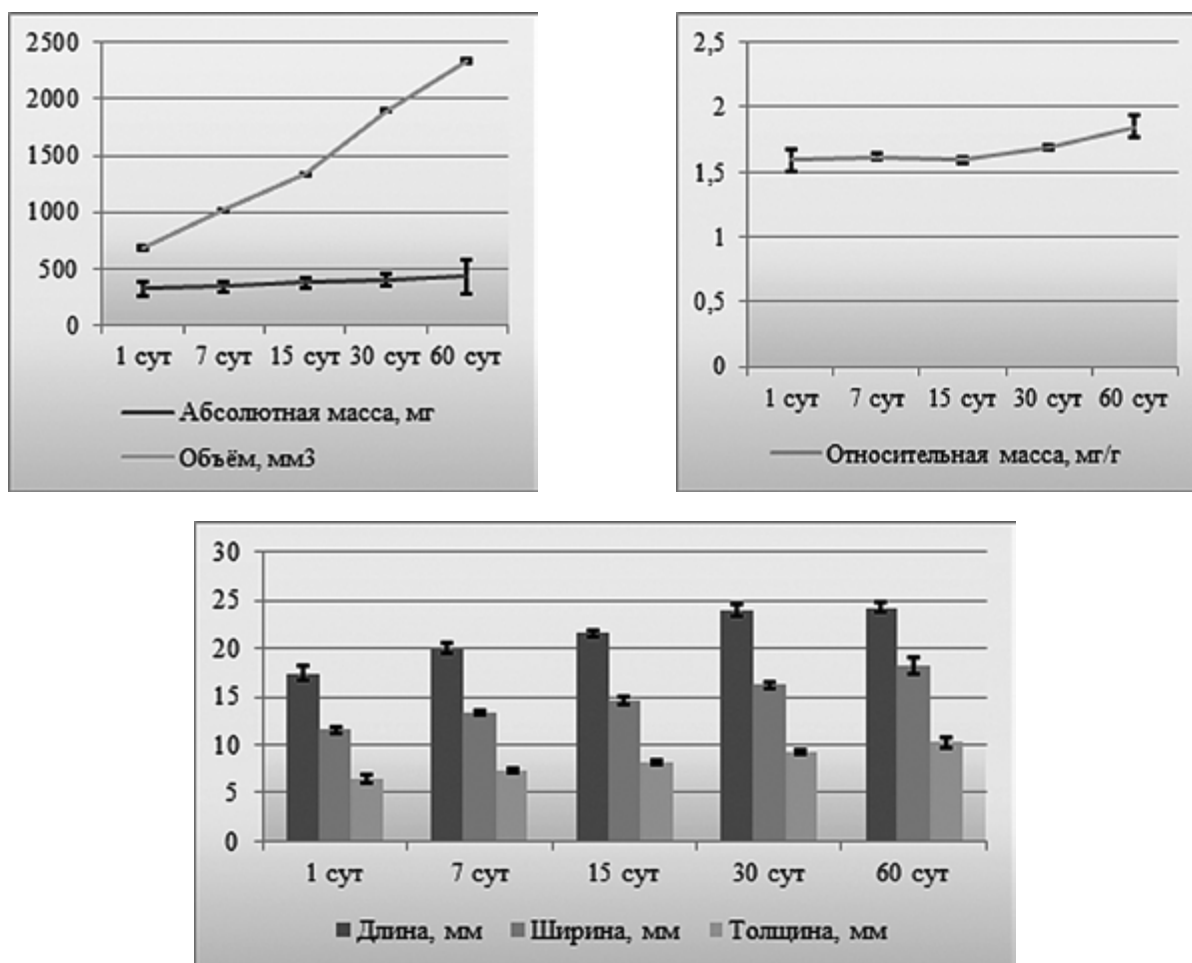


Рис. 2. Изменения органометрических показателей придатков семенников животных репродуктивного периода в контроле

После применения препарата общий план строения органа не изменился, однако была установлена динамика органометрических параметров органа. Так, достоверное отличие показателя было определено на 7, 15, 30-е сутки после окончания введения циклофосфида: абсолютная масса уменьшалась на 5,58 %, 8,62 % и 9,49 % соответственно.

Значения относительной массы изменялись односторонне и синхронно: уменьшение показателей составило 4,92 %, 5,61 % и 6,25 % соответственно срокам наблюдения. Линейные и объемные параметры органов после применения иммуносупрессора претерпевали сходные изменения. Так, статистически значимые отклонения были установлены на 7, 15, 30-е сутки (рис. 3).

Морфометрические параметры клеток эпителия придатка крыс контрольных групп претерпевали закономерную динамику по мере увеличения срока наблюдения (табл. 1).

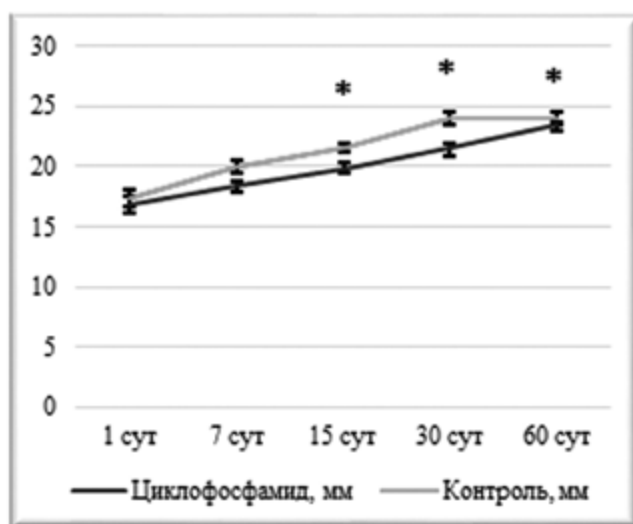
После применения циклофосфида морфометрические показатели эпителия достоверно отличались от значений контрольных данных. Так, высота и ширина клеток уменьшалась на 8,85, 10,64, 13,58 % и 6,52, 6,68 и 9,40 % соответственно 7, 15, 30-м суткам наблюдения (рис. 4).

Объем эпителиоцитов статистически значимо снижался в те же сроки относительно контрольных данных на 20,31, 22,00 и 29,18 % соответственно.

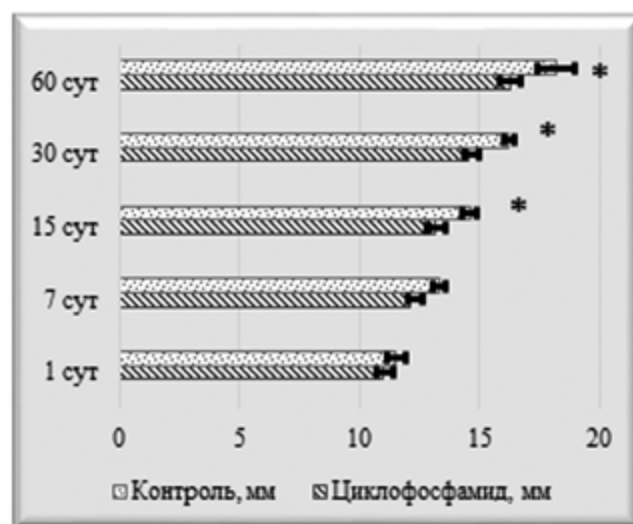
Размеры ядер эпителиоцитов также претерпевали достоверные изменения по сравнению с данными контрольной группы животных. Так, больший диаметр ядра после применения иммуносупрессора значимо уменьшался на 7,20 %, 7,09 % и 9,56 %, меньший диаметр – на 4,59 %, 7,20 % и 7,39 % на 7, 15, 30-е сутки наблюдения соответственно.

Величина объема ядер эпителиальных клеток, опосредованно отражающая их функциональное состояние, также достоверно изменялась под действием циклофосфида. Снижение показателей отмечалось на ранних и отдаленных сроках наблюдения на 15,52 %, 19,77 % и 22,45 % (7, 15, 30-е сутки). Через 60 дней после завершения введения препарата статистически значимых отличий между данными экспериментальной и контрольной групп по всем морфометрическим показателям ядер установлено не было, что может свидетельствовать о реадaptации морфоструктуры органа на поздних сроках эксперимента.

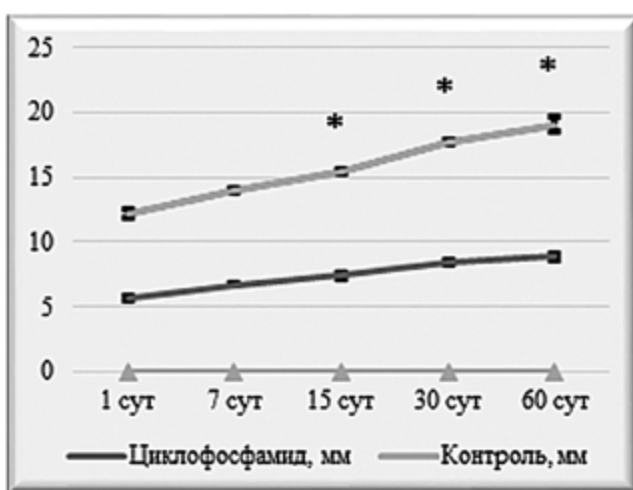
Отличия исследуемых параметров на 7, 15 и 30-е сутки после окончания введения циклофосфида от контрольных данных может быть вызвано



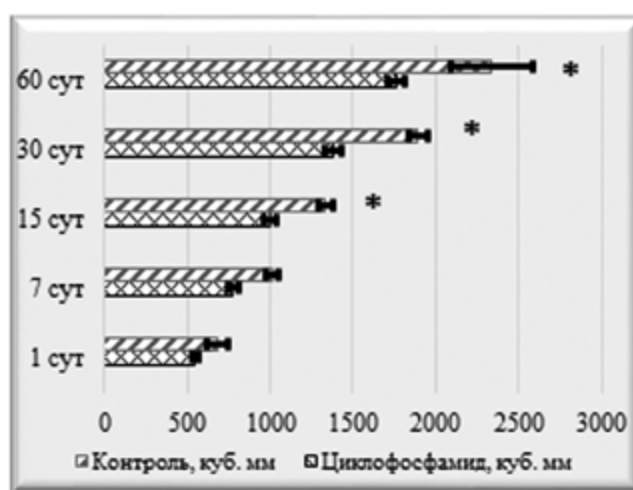
А



Б



В



Г

Рис. 3. Изменения длины (А), ширины (Б), толщины (В) и объема (Г) придатков семенников после применения циклофосфамида и в контроле:

* – статистически значимые отличия от контрольных данных ($p < 0,05$)

Таблица 1

Динамика микроморфометрических параметров эпителиоцитов придатков семенников крыс репродуктивного периода в контроле ($M \pm m$, $n=30$)

Параметры	Сроки наблюдения, сутки				
	1-е	7-е	15-е	30-е	60-е
Высота эпителиоцита, мкм	$18,66 \pm 0,25$	$20,22 \pm 0,21$	$20,87 \pm 0,26$	$21,68 \pm 0,59$	$21,74 \pm 0,85$
Ширина эпителиоцита, мкм	$11,50 \pm 0,44$	$11,97 \pm 0,19$	$12,68 \pm 0,17$	$13,08 \pm 0,22$	$13,56 \pm 0,55$
Объем эпителиоцита, мкм ³	$1292,10 \pm 72,12$	$1516,89 \pm 48,51$	$1756,90 \pm 67,52$	$1942,05 \pm 44,57$	$2092,98 \pm 236,21$
Больший диаметр ядра, мкм	$7,81 \pm 0,36$	$8,15 \pm 0,14$	$8,34 \pm 0,09$	$8,84 \pm 0,08$	$9,87 \pm 0,15$
Меньший диаметр ядра, мкм	$5,47 \pm 0,05$	$5,66 \pm 0,04$	$6,18 \pm 0,07$	$6,34 \pm 0,09$	$7,36 \pm 0,18$
Объем ядра, мкм ³	$122,35 \pm 8,31$	$136,70 \pm 1,56$	$166,77 \pm 8,22$	$185,75 \pm 7,65$	$279,94 \pm 15,12$

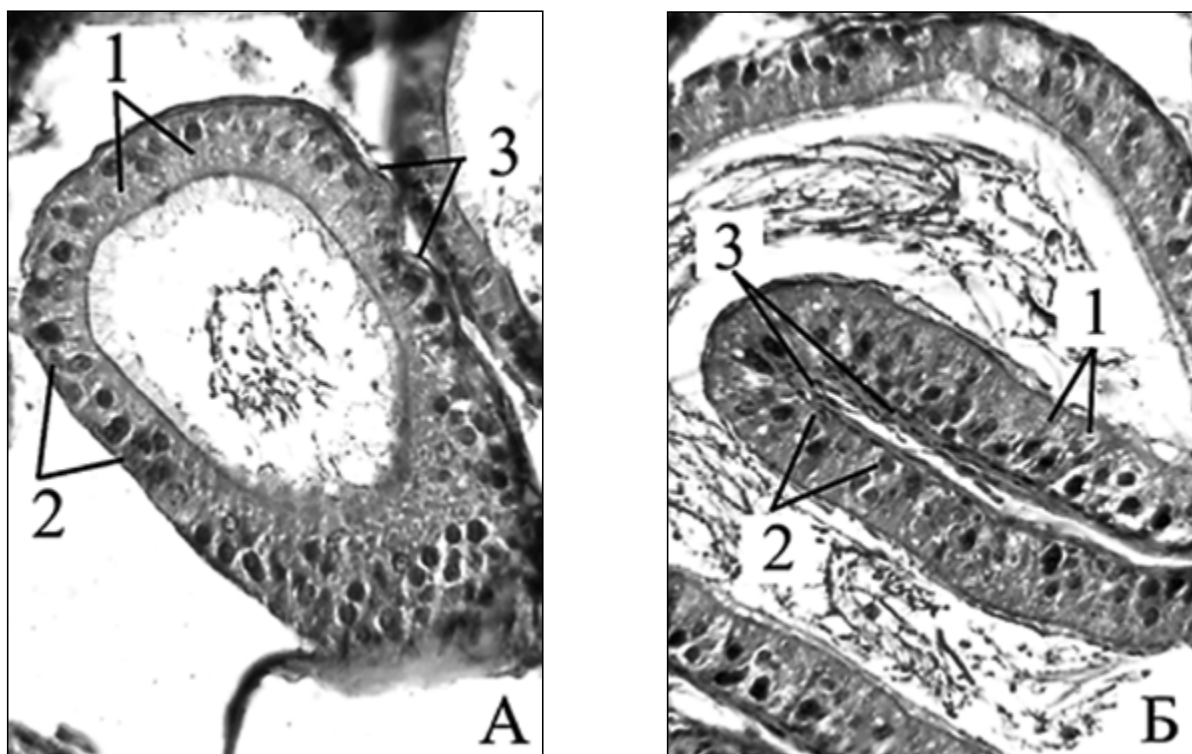


Рис. 4. Участок придатка семенника животных репродуктивного периода:
А – через 7 суток после применения циклофосфамида; Б – через 7 суток после применения 0,9 %-го раствора натрия хлорида; 1 – реснитчатые клетки, 2 – вставочные клетки, 3 – стенка протока. Окраска гематоксилин-эозином.
Увеличение: приближение: Zoom 18,5. Объектив: PlanCN40x/0,65 ∞/0,17/FN22

интенсивной кумуляцией его токсического действия в результате длительного применения, что, в то же время, объясняет отсутствие достоверных изменений на 1-е сутки наблюдения. Также одним из фармакодинамических эффектов препарата в иммуносупрессивной дозировке является дезорганизация биосинтетического и митохондриального аппаратов клетки, что приводит к нарушениям ее энергетического и метаболического обмена и выполняемых функций. Подобные результаты были получены В. И. Звягиной и соавт. [9] при изучении структурно-функциональных изменений митохондриального ферментного комплекса в условиях угнетения его активности в клетках придатка семенника. Ранняя реакция органов со стороны мужской половой системы в ответ на иммуносупрессивное воздействие комплекса ингаляционных поллютантов также установлено исследованиями В. Г. Ковешникова и соавт. [10]. Кроме непосредственного влияния иммуносупрессора на морфоструктуру изучаемого органа возможно и опосредованное – путем нарушения гормон-зависимой регуляции взаимодействия структурно-функциональных элементов придатка. Так, угнетающее влияние однократного применения высокой дозы циклофосфамида на андроген-рецепторный аппарат поддерживающих клеток и glanduloцитов семенников крыс репродуктивного периода доказано К. Н. Лапиным и соавт. [11]. И. В. Бобрышева [12] также указывает на выраженную реакцию гонадотропоцитов аденогипофиза, сопровождающуюся угнетением

их активности в ответ высокую дозу циклофосфамида, что может приводить к гормональной дисрегуляции морфогенеза придатка семенника.

Отсутствие статистически значимых отличий исследуемых параметров на 60-е сутки после окончания введения циклофосфамида может объясняться высоким адаптационным потенциалом органа, а также развитием риадаптационных процессов, обусловленных фармакокинетическими особенностями препарата.

ВЫВОДЫ

1. Со стороны придатка семенника установлена выраженная реакция на длительную иммуносупрессию, о чем свидетельствует достоверное изменение морфометрических показателей органа.

2. Статистически значимое снижение органомерических параметров придатка выявлено как на ранних (7-е и 15-е сутки), так и поздних сроках наблюдения (30-е сутки), что вызвано интенсивной кумуляцией иммуносупрессивного действия.

3. Изменения на микроскопическом уровне коррелируют со снижением макроскопических показателей, что объясняется прямым цитотоксическим действием циклофосфамида на синтетический аппарат клеток.

4. Дальнейшее изучение строения органа в условиях длительной иммуносупрессии будет проведено на животных периода выраженных старческих изменений.

1. Луньова Г. Г., Ліпкан Г. М., Заведецька О. Г. Дослідження еякуляту у діагностиці чоловічого непліддя : навч. посіб. Київ : Нац. мед. академія післядипл. освіти ім. П. Л. Шупика, 2010. 118 с.
2. Романюк А. М., Сауляк С. В., Москаленко Р. А., Москаленко Ю. В. Вплив солей важких металів на сперматогенну функцію і її корекція препаратом тивортин // Лікувальна справа. 2012. № 1–2. С. 123–128.
3. Кашченко С. А., Бобрышева И. В. Особенности гистологического строения белой пульпы селезенки крыс в разные периоды постнатального онтогенеза в условиях экспериментальной иммуносупрессии // Журн. Гроднен. гос. мед. ун-та. 2014. № 1. С. 51–54.
4. Вільхова О. В. Сучасні погляди на гістологічні особливості органів чоловічої статеві системи // Світ медицини та біології. 2017. № 1 (59). С. 186–191.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб. : Объединение специалистов по работе с лабораторными животными, 2012. 48 с.
6. Ikebuaso A. D., Yama O. E., Duru F. I., Oyebadejo S. A. Experimental testicular torsion in a rat model: effects of treatment with Pausinystalia macrocarpa on testis functions // J Reprod Infertil. 2012. Vol. 13 (4). P. 218–224.
7. Erfani M. N. Bahrami M., Morovati H., Najafzadehvarzi H. The protective effect of aloe vera on histological and histometrical structure of diabetic rat testis // Scientific-Research Iranian veterinary journal. 2013. Vol. 9. № 2 (39). P. 78–87.
8. Ипастова И. Д. Макро- и микроморфология головного мозга и мозжечка белой крысы // Вестн. башкир. гос. аграр. ун-та. 2014. № 4 (32). С. 30–35.
9. Звягина В. И., Бельских Э. С., Медведев Д. Э. Изучение функционального состояния митохондрий придатка яичка крыс в условиях изменения синтеза оксида азота (II) // Казан. мед. журн. 2015. Т. 96. № 5. С. 814–818.
10. Ковешников В. Г., Фомина К. А., Лузин В. И. Экологическая морфология органов эндокринной, иммунной и костной систем в условиях хронического ингаляционного влияния летучих компонентов эпоксидных смол // Астрахан. мед. журн. 2013. Т. 8. № 1. С. 128–130.
11. Лапин К. Н., Захарова Н. М. Влияние циклофосфамида на половые клетки крыс. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино : Fix-Print, 2017. С. 773–776.
12. Бобрышева И. В. Морфофункциональные особенности гонадотропных эндокриноцитов дистальной части аденогипофиза крыс при экспериментальной иммуносупрессии // Ульянов. мед.-биол. журн. 2016. № 3. С. 135–144.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кашченко Светлана Аркадьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Луганский государственный медицинский университет им. святителя Луки, ЛНР, г. Луганск; e-mail: masterhist@mail.ru.

Захаров Алексей Александрович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Луганский государственный медицинский университет им. святителя Луки, ЛНР, г. Луганск; e-mail: masterhist@mail.ru.

ABOUT THE AUTHORS

Kashchenko Svetlana Arkadyevna – Doctor of Science (Medicine), Professor, Head of Histology, Cytology and Embryology Department, Lugansk State Medical University, Lugansk People's Republic; e-mail: masterhist@mail.ru.

Zakharov Aleksei Aleksandrovich – PhD (Medicine), Associate Professor, Histology, Cytology and Embryology Department, Lugansk State Medical University, Lugansk People's Republic; e-mail: masterhist@mail.ru.