

© М. Л. Сизоненко, Г. В. Брюхин, Д. С. Ласьков, 2013  
УДК 613.81:612.65:612.62:599.323.4

*М. Л. Сизоненко, Г. В. Брюхин и Д. С. Ласьков*

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав — проф. Г. В. Брюхин), Челябинская государственная медицинская академия

С использованием обзорных гистологических и морфометрических методов исследованы особенности сперматогенного пласта у потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией, которую создавали до наступления беременности путём замены питьевой воды на 15% раствор этилового спирта в течение 3 мес. Всего исследованы 62 крысенка в различные сроки постнатального периода (15-, 30-е и 45-е сутки): 32 — интактных (из 10 помётов) и 30 — подопытных (из 8 помётов). Показано, что у потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией имеет место угнетение процессов сперматогенеза, что нашло свое отражение в снижении площади извитых семенных канальцев (ИСК), уменьшении количества клеток сперматогенного пласта, увеличении числа ИСК со слущенным эпителием и гигантских сперматогенных клеток, а также уменьшении индекса сперматогенеза, отражающего среднее количество слоёв сперматогенных клеток в каждом ИСК.

**Ключевые слова:** *извитые семенные каналцы, сперматогенез, патология печени матери*

Общепризнано, что здоровье детей, особенно в ранний постнатальный период, тесно связано с состоянием здоровья их родителей и, прежде всего, матерей. Одной из важнейших причин перинатальной патологии являются экстрагенитальные заболевания женщин детородного возраста [11], в структуре которых особое место занимают болезни гепатобилиарной системы [5], в том числе возникающие при хронической алкогольной интоксикации, приводящей к эндокринным сдвигам в гипоталамо-гипофизарной системе [4], а также способной оказывать непосредственное гонадотоксическое действие [1].

Многочисленные работы по изучению влияния хронической алкогольной интоксикации матери на морфофункциональное становление систем жизнеобеспечения потомства имеют односторонний, а подчас и противоречивый характер [1, 4, 9]. В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ особенностей сперматогенного пласта в различные сроки постнатального периода у потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией.

Материал и методы. Исследовали потомство белых лабораторных крыс самок с хронической алкогольной интоксикацией, которую вызывали путём замены питьевой воды 15% раствором этилового спирта в течение 3 мес. После чего у них было выявлено поражение печени, о наличии которого судили на основании морфологических (жировая дистрофия

гепатоцитов, расширение синусоидных капилляров и перисинусоидного пространства, дисконфлексация печеночных пластинок, умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы печени, очаговые некротические изменения гепатоцитов), биохимических (повышение активности аспаргатаминотрансферазы,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, повышение концентрации билирубина) и иммунологических (высокий титр противопечёночных антител) критериев. Через 3 мес после начала эксперимента животные получали свободный доступ к питьевой воде. Через 1 нед самок подсаживали к интактным половозрелым самцам. Всего исследованы 62 крысенка: 32 — интактных (из 10 помётов) и 30 — подопытных (из 8 помётов). Животных декапитировали на 15-, 30-е и 45-е сутки постнатального периода развития под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Для световой микроскопии семенники фиксировали в жидкости Буэна. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином Майера — эозином [6]. При оценке сперматогенного пласта использовали общепринятые критерии [10]. На светооптическом уровне на срезах при помощи морфометрической установки Motic VA400 (Motic, Германия) определяли площадь поперечного сечения извитых семенных канальцев (ИСК), подсчитывали в них количество ядер sustentоцитов. На поперечных срезах ИСК (n=50) определяли суммарное содержание клеток сперматогенного пласта, число сперматогоний различных типов, первичных и вторичных сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов, с последующим перерасчетом этих показателей на 1 ИСК. Кроме того, подсчитывали количество канальцев со слущенным эпителием, гигантских сперматогенных клеток и определяли клеточный индекс, т. е. отношение количества сперматогенных клеток в ИСК к количеству sustentоцитов

### Сведения об авторах:

*Сизоненко Максим Леонидович* (e-mail: maximus\_74.79@mail.ru), *Брюхин Геннадий Васильевич*, *Ласьков Дмитрий Сергеевич* (e-mail: laskov\_2009@mail.ru), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Челябинская государственная медицинская академия, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

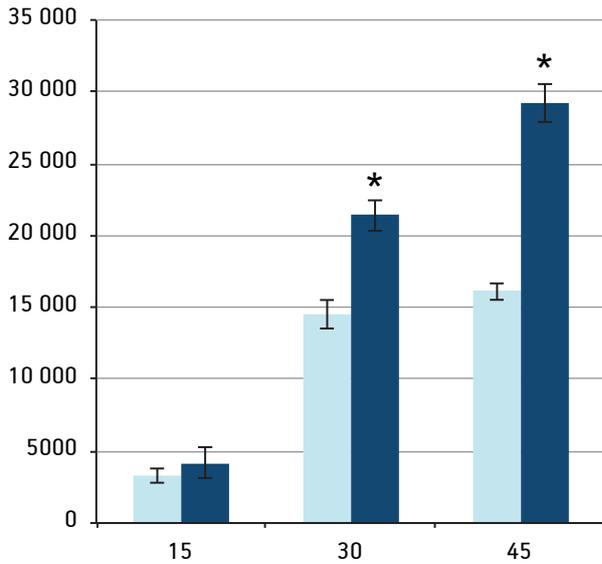


Рис. 1. Площадь поперечного сечения извитых семенных канальцев семенников у потомства интактных крыс (светлые столбики) и крыс с хронической алкогольной интоксикацией (темные столбики)

По оси абсцисс — возраст животных (сут); по оси ординат — исследованный параметр (мкм<sup>2</sup>). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки; звездочки — различия по сравнению с показателями у интактных животных значимы при  $P < 0,05$

в тех же канальцах. Определяли среднее количество слоев в сперматогенном пласте на 100 поперечных срезах ИСК и пересчитывали на 1 ИСК (индекс сперматогенеза).

Полученные цифровые данные обрабатывали на компьютере с использованием программы Statistica 6.0. (Statsoft, Inc.). Учитывая небольшую выборку животных, значимость сравниваемых величин определяли по непараметрическому критерию Манна—Уитни [7].

**Результаты исследования.** Установлено, что у всех животных интактной и подопытной групп в течение раннего постнатального онтогенеза происходит постепенное увеличение площади поперечного сечения ИСК (рис. 1), достигающей максимальных значений к периоду полового созревания. Эти показатели у животных подопытной группы во все сроки исследования выше, чем в контрольной группе.

Анализ суммарного содержания сперматогенных клеток в ИСК позволил установить, что в процессе постнатального развития у животных интактной и подопытной групп происходит постепенное увеличение их количества, достигающее максимума к периоду полового созревания. Так, у 15-суточных крысят интактной группы содержание сперматогенных клеток в ИСК составило  $50,7 \pm 2,2$ , к 30-м суткам —  $123,9 \pm 2,0$ , а к периоду полового созревания —  $140,3 \pm 2,8$ . Аналогичная закономерность выявлена и у животных подопытной группы. Количество клеток составило соот-

ветственно  $41,9 \pm 0,6$ ,  $110,4 \pm 2,5$  и  $126,6 \pm 1,0$ . Таким образом, во все сроки исследования данный показатель у подопытных животных оказался ниже, чем у интактных ( $P < 0,05$ ).

У интактных животных с возрастом происходит постепенное увеличение количества сперматогоний различных степеней зрелости: у 15-суточных крысят в перерасчете на 1 ИСК оно составило  $23,9 \pm 0,3$ , на 30-е сутки —  $31,4 \pm 0,5$ , а к 45-м суткам оно возросло до  $40,8 \pm 0,6$ . Аналогичная закономерность выявлена и у животных подопытной группы: так, у 15-, 30- и 45-суточных крысят количество сперматогоний в ИСК составило  $20,15 \pm 0,26$ ,  $28,4 \pm 0,8$  и  $36,62 \pm 0,19$ . Таким образом, можно констатировать, что у животных экспериментальной группы количество сперматогоний в ИСК значительно снижено во все сроки исследования по сравнению с таковым в контроле.

В процессе постнатального развития количество сперматозидов у животных интактной и подопытной групп постепенно увеличивается и достигает максимума к периоду полового созревания, однако в ИСК у животных подопытной группы оно значительно ниже, чем в контроле ( $P < 0,05$ ).

В постнатальном периоде у животных интактной и подопытной групп в ИСК происходит также изменение содержания сперматид. У 15-суточных крысят контрольной группы их количество составило  $0,31 \pm 0,05$ , на 30-е сутки —  $0,60 \pm 0,09$ , а к периоду полового созревания —  $1,221 \pm 0,019$ . Аналогичная закономерность выявлена и у животных подопытной группы. Так, у 15-суточных крысят этот показатель составил  $0,051 \pm 0,010$ , у 30-суточных —  $0,29 \pm 0,06$ , а на 45-е сутки он увеличился до  $0,91 \pm 0,03$ . Обращает на себя внимание то, что количество сперматид у животных подопытной группы меньше, чем в контроле ( $P < 0,05$ ).

Сперматозоиды в ИСК у контрольных и подопытных животных выявляются только в период полового созревания (45-е сутки жизни). При этом у подопытных животных содержание сперматозоидов значительно снижено ( $0,660 \pm 0,028$ ) по сравнению с таковым у интактных крысят ( $1,01 \pm 0,09$ ).

Для оценки сперматогенного пласта подсчитывали количество ИСК со слущенным эпителием, клетки которого потеряли связь с клетками своего клона и находятся в просвете канальца (рис. 2, а).

У интактных крысят количество канальцев со слущенным эпителием максимально на 15-е сутки, после чего наблюдается его снижение, достигающее минимума к периоду полового созревания. Аналогичная закономерность обнаружена и у животных подопытной группы, у которых во все исследованные сроки этот показатель выше,

чем у животных интактной группы ( $P < 0,05$ ). Подсчет гигантских клеток (см. рис. 2, б) установил, что у животных обеих групп их количество с возрастом увеличивается. В то же время, у животных подопытной группы оно во все сроки исследования превышает аналогичные показатели в контроле ( $P < 0,05$ ).

Одним из важнейших критериев сохранности процесса сперматогенеза является индекс сперматогенеза. У всех животных интактной и подопытной групп после рождения происходит постепенное его увеличение. Наибольших значений он достигает к периоду полового созревания. У 15-суточных крысят интактной группы этот индекс составил  $2,220 \pm 0,008$ , к 30-м суткам —  $2,250 \pm 0,012$ , а к 45-м суткам —  $2,40 \pm 0,019$ . Индекс сперматогенеза у животных подопытной группы составил соответственно  $1,970 \pm 0,011$ ,  $2,060 \pm 0,022$  и  $2,32 \pm 0,05$ . Таким образом, этот показатель у животных подопытной группы значимо ниже, чем у интактных животных на 15-е и 30-е сутки наблюдения.

Обсуждение полученных данных. В структуре острых и хронических поражений печени в последние годы превалирует алкогольное поражение, в частности алкогольный стеатоз, гепатит и цирроз [9, 12–14]. Печень, пораженная токсичными метаболитами окисления алкоголя, перестает в должной мере выполнять свои жизненно важные функции. Одной из таких функций является дезинтоксикация эндогенных и экзогенных ксенобиотиков. Логично предположить, что недоокисленные продукты (шлаки), а также противопеченочные антитела, сенсibilизированные цитотоксические лимфоциты и циркулирующие иммунные комплексы [3, 8] проходят через плаценту и нарушают условия внутриутробного развития. В конечном итоге, эти изменения обуславливают нарушение процессов морфогенеза и, как следствие, задержку морфофункционального становления различных систем организма, в том числе половой системы.

У потомства матерей с хронической алкогольной интоксикацией происходило уменьшение суммарного содержания сперматогенных клеток,

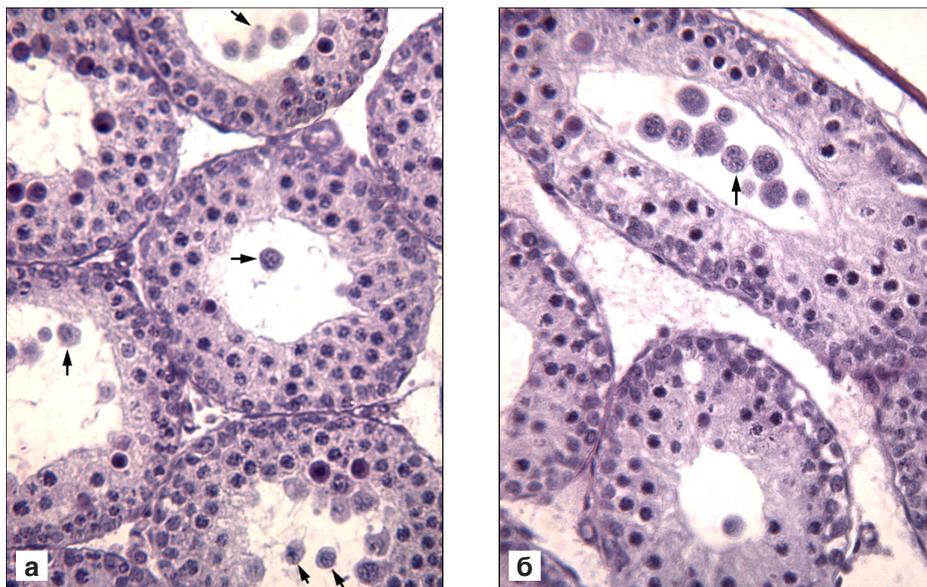


Рис. 2. Извитые семенные каналцы 45-суточного крысёнка, подвергавшегося внутриутробно алкогольной интоксикации.

а — в просветах каналцев многочисленные слущенные клетки (стрелки); б — двуядерная гигантская сперматогенная клетка (стрелка). Гематоксилин – эозин. Об. 40, ок. 10

а также сперматогоний различной степени зрелости, первичных и вторичных сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов. Одним из наиболее чувствительных морфологических критериев активности сперматогенеза является содержание сперматогоний в ИСК [10]. Обращает на себя внимание также увеличение у подопытных крысят числа каналцев со слущенным эпителием и дегенеративными формами сперматогенных клеток. Гигантские сперматогенные клетки относятся к дегенеративным формам сперматогенных клеток, зачастую слущенных в просвет каналца и являющихся одним из критериев оценки гипоксического повреждения сперматогенного пласта [2]. В литературе нам не удалось встретить данных о влиянии хронического алкогольного поражения печени матери на становление сперматогенеза у потомства. В то же время имеются многочисленные клинические наблюдения и экспериментальные исследования, свидетельствующие о влиянии алкоголя на сперматогенез. Так, установлено, что алкоголь обуславливает уменьшение просвета ИСК, а также снижение числа клеток сперматогенного пласта, вплоть до их полного исчезновения и формирования синдрома «только sustentоциты», увеличение дегенеративных форм сперматогенных клеток [6–8]. При этом J. E. Oni и соавт. [15] установили, что введение спирта различной концентрации половозрелым самкам мышей до и во время беременности приводит, прежде всего, к нарушению спермиогенеза у потомства и, как следствие, уменьшению числа сперматозоидов.

Таким образом, выявленные нами изменения сперматогенного пласта у потомства самок крыс с хроническим алкогольным поражением печени имеют неспецифический характер и во многом сходны с таковыми, выявленными другими исследователями при изучении прямого действия этанола на сперматогенез. В целом, результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что у матерей с хронической алкогольной интоксикацией рождается потомство с нарушенным репродуктивным здоровьем.

## ЛИТЕРАТУРА

- Аккер Л. В. Течение беременности и исход родов у женщин, страдающих алкоголизмом. Вестн. Рос. Ассоц. акушеров-гинекологов, 2000, № 3, с. 95–98.
- Апсалямов В. Х., Бажанов А. Н. и Савенко В. А. Многоядерные клетки сперматогенного пласта у крыс как критерий гипоксического повреждения семенника. Морфология, 1993, т. 104, вып. 1–2, с. 102–106.
- Брюхин Г. В. Влияние хронической патологии печени различного генеза матери на становление систем жизнеобеспечения потомства в условиях эксперимента. В кн.: Роль патологии печени матери в нарушении развития, реактивности и резистентности потомства в условиях эксперимента. Челябинск, Изд-во ЧелГМА, 2004, с. 189–194.
- Кузнецова А. Б. и Брюхин Г. В. Особенности структурно-функционального становления нейросекреторных клеток паравентрикулярного ядра у потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Изв. Челябинск. науч. центра, 2006, вып. 2 (32), с. 110–113.
- Михайленко Е. Т., Закревский А. А., Богдашкин Н. Г. и др. Беременность и роды при хронических заболеваниях гепатобилиарной системы. Киев, Здоровье, 1990.
- Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Институт лит-ры, 1962.
- Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., МедиаСфера, 2006.
- Сизоненко М. Л. и Брюхин Г. В. Влияние хронической экспериментальной патологии печени матери на эндокринную функцию мужских половых желез потомства. Пробл. репродукции, 2008, т. 10, вып. 2, с. 45–47.
- Скальный А. В., Курчашова С. Ю. и Вятчанина Е. С. Изучение роли дисбаланса цинка и других микроэлементов в патогенезе алкоголизма и алкогольной эмбриофетопатии в России. Наркология, 2008, т. 77, № 5, с. 26–33.
- Ухов Ю. И. и Астраханцев А. Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. Арх. анат., 1983, т. 84, вып. 3, с. 66–69.
- Яковцова А. Ф., Марковский В. Д., Васюта В. С. и Сорокина И. В. Перинатальная патология и группы риска в постнатальном онтогенезе. Арх. пат., 1990, т. 52, № 7, с. 30–35.
- Bouchier I. A. D., Hislop W. S. and Prescott R. J. A prospective study of alcoholic liver disease and mortality. J. Hepatol., 1992, v. 16, p. 290–297.
- Day C. Alcoholic liver diseases. Česka slovenska gastroenterol. hepatol., 2006, v. 60, № 1, p. 67–70.
- Enomoto N., Takese S., Takada N. et al. Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. Hepatology, 1991, v. 13, p. 1071–1075.
- Onu J. E., Ezeasor D. N. and Ihemelandu E. C. Histological evidence of retardation of spermatogenesis in mice in experimentally induced fetal alcohol syndrome. Pakistan J. Biol. Sci., 2003, v. 22, № 6, p. 1860–1863.
- Pajarinen J. T. and Karhunen P. J. Spermatogenic arrest and «Sertoli cell-only» syndrome — common alcohol-induced disorders of human testis. Int. J. Androl., 1994, v. 17, № 6, p. 292–299.
- Pajarinen J. T., Karhunen P. J., Savolainen V. et al. moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 1996, v. 20, № 2, p. 332–337.
- Semczuk M. Morphological research on the male gonad in long-lasting alcoholization in rats. Gegenbaurs Morph. Jahrb., 1978, Bd. 124, S. 546–558.

Поступила в редакцию 27.08.2011  
Поступила после доработки 17.01.2012

#### MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SPERMATOGENESIS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

*M. L. Sizonenko, G. V. Briukhin and D. S. Las'kov*

Using general histological and morphometric methods, the peculiarities of spermatogenic epithelium were studied in the offspring of female rats with chronic alcohol intoxication, which was created before the onset of pregnancy by substitution of the drinking water by 15% solution of ethyl alcohol for the period of 3 months. Total number of animals was equal to 62 rat pups which were studied at postnatal days 15, 30 and 45, including 32 rats of the intact group (10 litters) and 30 pups of the experimental group (8 litters). It was found that in the offspring of female rats with chronic alcohol intoxication, the inhibition of the processes of spermatogenesis took place, as reflected by the reduction in the area of the convoluted seminiferous tubules (CST), decrease in the number of spermatogenic cells of the seminiferous layer, increase in the proportion of CST with desquamated epithelium and giant spermatogenic cells, as well as by the reduction of spermatogenic index, which reflects the average number of layers of spermatogenic cells in each CST.

**Key words:** *testes, convoluted seminiferous tubules, spermatogenesis, maternal liver pathology*

Department of Histology, Embryology and Cytology, Chelyabinsk State Medical Academy