

© М. Л. Сизоненко, Г. В. Брюхин, 2014
УДК 591.87:591.463.2:599.323.4

М. Л. Сизоненко и Г. В. Брюхин

ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕМЕННИКОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ — ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

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

Исследовано влияние хронического поражения гепатобилиарной системы различного генеза самок крыс на становление сперматогенного эпителия в семенниках их новорожденного потомства. Моделировали токсическое (CCl_4 , галактозамин) и лекарственное (тетрациклин, парацетамол) поражение печени. Оценку состояния сперматогенного эпителия семенников проводили на серийных гистологических срезах с использованием морфометрической установки. Выявлено, что у подопытных животных имеет место уменьшение диаметра и площади сечения извитых семенных канальцев (ИСК), суммарного содержания сперматогенных клеток, сперматогоний различных генераций, суммарного количества сперматоцитов и суспензиоцитов. У крысят всех экспериментальных групп происходит увеличение количества ИСК со слущенным эпителием, а также многоядерных сперматогенных клеток с фрагментированными и пикнотизированными ядрами.

Ключевые слова: семенники, сперматогенез, патология печени у матери

По данным многочисленных исследователей, частота бесплодных браков в России превысила критический уровень (15%) и не имеет тенденции к снижению [2]. При этом, повсеместно наблюдается постоянный рост мужского фактора бесплодного брака, который превышает 50% и обуславливает высокие демографические потери [8]. В настоящее время патогенез мужского бесплодия до конца не изучен, поэтому исследование репродуктивного здоровья мужчин является актуальным и составляет одно из приоритетных направлений Национального проекта «Здоровье».

Известно, что морфофункциональное становление различных систем организма в постнатальном периоде во многом определяется особенностями внутриутробного развития. При этом, период новорожденности отражает их стартовые возможности. Эти теоретические предпосылки легли в основу изучения особенностей сперматогенного эпителия у новорожденных крысят от самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Материал и методы. Работа выполнена на 60 взрослых половозрелых самках крыс линии Вистар и их новорожденном потомстве (82 крысенок из 60 пометов) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». У крыс-самок моделировали хроническое поражение печени токсической и лекарственной этиологии. Токсическое поражение печени создавали путем введения 40% масляного раствора CCl_4 (дважды в неделю в

течение 2 мес) [4] и D-галактозамина гидрохлорида (Sigma — G500, США) (однократно внутривбрюшинно в дозе 250 мг/кг массы тела животного). Группу Т1 составили 12 новорожденных крысят из 12 пометов, матери которых получали CCl_4 , а группу Т2 — 20 крысят из 10 пометов, матери которых получали D-галактозамин. Лекарственное поражение печени у самок создавали с помощью тетрациклина и парацетамола. Тетрациклин вводили в 1% крахмальном растворе в дозе 1,5 г/кг массы тела ежедневно в течение 5 сут, а парацетамол — в дозе 2,5 г/кг массы тела в течение 2 сут. Группу Л1 составили 12 новорожденных крысят из 12 пометов, матери которых получали тетрациклин, группу Л2 — 15 крысят из 14 пометов, матери которых получали парацетамол. О развитии патологического процесса в печени самок судили на основании морфологических изменений (очаговые некротические изменения гепатоцитов, дискомплексация печеночных пластинок, периваскулярная лимфогистиоцитарная инфильтрация, гипертрофия и гиперплазия звездчатых макрофагов — купферовских клеток, биохимических критериев (повышение концентрации билирубина, аланин- и аспартатаминотрансфераз) и высокого титра печеночных аутоантител (1:320 и 1:640). На 7-е сутки после моделирования поражения печени у самок крыс к ним подсаживали интактных самцов. Беременность у подопытных животных наступала в течение 5–10 сут. Контрольную группу (К-группа) составили новорожденные животные (23 крысенок из 12 пометов), родившиеся от матерей, не подвергавшихся токсическому воздействию.

Объектом исследования явились семенники 1-суточного потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы. У крысят первоначально определяли абсолютную и относительную массу семенников, затем на серийных гистологических срезах семенников, окрашен-

Сведения об авторах:

Сизоненко Максим Леонидович (e-mail: maximus_74.79@mail.ru), Брюхин Геннадий Васильевич (e-mail: kanc@vita.chel.su), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Челябинская государственная медицинская академия, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

ных гематоксилином — эозином, оценивали состояние сперматогенного эпителия [6], определяя при помощи морфометрической установки Motic BA400 (Motic, Германия) площадь сечения извитых семенных канальцев (ИСК), суммарное количество сперматогенных клеток и их субпопуляционный состав из расчета на один ИСК, а также количество ИСК со слущенным эпителием и суммарное число гигантских сперматогенных клеток в 30 поперечных срезах ИСК. Определяли также клеточный индекс, представляющий собой отношение общего количества сперматогенных клеток в 30 поперечно срезанных ИСК к числу суспендоцитов, подсчитанных в этих канальцах.

Полученные цифровые данные обрабатывали на компьютере с использованием программы Statistica v.6.0. (Stasoft, Inc.), PAST (v.2.17b) [3], при этом проводили сравнение средних значений показателей в ходе однофакторного дисперсионного анализа с последующими попарными сравнениями методами Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. У всех крысят подопытных групп имеет место снижение весового индекса семенника. Так, если у интактных крысят исследуемый показатель составил $0,130 \pm 0,003$, то у животных обеих токсических групп он оказался равным, соответственно, $0,120 \pm 0,006$ и $0,058 \pm 0,005$. У новорожденных крысят от самок с лекарственным поражением печени данный показатель также оказался значимо сниженным по сравнению с контролем (соответственно $0,059 \pm 0,006$ и $0,023 \pm 0,015$).

Диаметр ИСК почти у всех экспериментальных животных был снижен по сравнению с таковым в контроле (рисунк, а). Наиболее выраженное снижение исследуемого показателя выявлено у новорожденных крысят Т1-группы и Л1-группы. Исключение составили крысята Т2-группы (галактозамин), у которых диаметр ИСК несколько превысил таковой в контроле (см. рисунок, а). Эти данные находятся в полном соответствии с результатами, полученными при анализе величины площади поперечного сечения ИСК (см. рисунок, б).

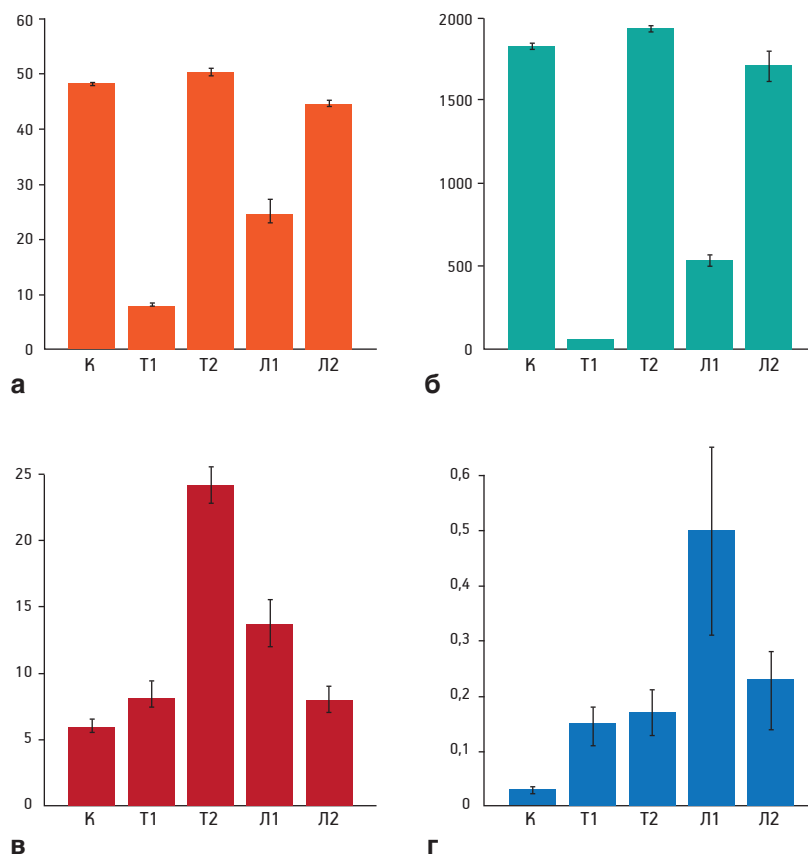
В ИСК у новорожденных крысят интактной группы в составе сперматогенного эпителия выявляются сперматогонии и единичные сперматоциты. У крысят всех экспериментальных групп наблюдается значимое снижение суммарного содержания сперматогенных клеток по сравнению с таковым у интактных новорожденных крысят. У крысят всех подопытных групп происходит также снижение суммарного содержания сперматогоний, при этом наиболее выраженное (на 17,6%) — у крысят токсической группы Т1. Анализ субпопуляционного состава сперматогоний по степени их зрелости позволил выявить, что содержание малодифференцированных сперматогоний (тип А) у подопытных животных всех групп снижено по сравнению с контролем за исключением крысят группы Т1, у которых исследуемый показатель значимо превысил таковой у интактных животных. При этом, у всех подопытных животных содержание сперматогоний конечной степени зрелости существенно было снижено по сравнению с контролем. Суммарное содержание первичных и вторичных сперматоцитов у подопытных крысят также было значимо ниже, чем в контроле. Наиболее выраженное снижение данного показателя выявлено у крысят групп Л1 и Л2 (таблица).

Сперматиды и сперматозоиды в ИСК у интактных и подопытных крысят в период новорожденности отсутствуют. Кроме того, выявлено снижение количества суспендоцитов в ИСК у всех подопытных крысят по сравнению с таковым у

Содержание клеток сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев у новорожденных крысят, родившихся от интактных самок (контроль) и с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы ($\bar{x} \pm \bar{s}$)

Группа животных	Вводимые вещества	Суммарное содержание сперматогенных клеток	Сперматогонии					Первичные и вторичные сперматогонии	Суспензогонии (клетки Сертоли)	Клеточный индекс Сертоли
			Суммарное содержание	Тип		Б				
				А	П					
Контрольная	—	17,830±0,003	12,330±0,005	6,10±0,026	5,00±0,26	1,230±0,003	5,50±0,026	3,90±0,026	4,57±0,03	
Токсическая, Т1	CCl ₄	14,160±0,002*	8,930±0,002*	7,80±0,26*	0,80±0,026*	0,330±0,003*	5,230±0,003*	4,930±0,003*	2,870±0,003*	
Токсическая, Т2	Галактозамин	12,4±0,4*	10,0±0,4*	5,73±0,25*	3,66±0,17*	0,650±0,020*	2,40±0,14*	3,37±0,12*	3,71±0,17*	
Лекарственная, Л1	Тетрациклин	13,3±0,4*	11,5±0,4*	5,49±0,23*	5,18±0,16	0,82±0,20*	1,85±0,22*	3,56±0,08*	3,74±0,03*	
Лекарственная, Л2	Парацетамол	12,7±0,3*	11,01±0,20*	5,40±0,21*	5,27±0,17	0,340±0,020*	1,720±0,020*	3,52±0,06*	3,72±0,14*	

* Различия значимы по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$.



Характеристика извитых семенных канальцев (ИСК) у новорожденных крысят.

а — диаметр ИСК (мкм); б — площадь поперечного сечения ИСК (мкм²); в — количество ИСК со слущенным эпителием; г — количество ИСК с гигантскими сперматогенными клетками. По осям абсцисс — группы животных: К — контрольная (потомство intactных крыс); T1 и T2 — крысят от самок с токсическим поражением печени (CCl₄, D-галактозамин соответственно); L1 и L2 — крысят от самок с лекарственным поражением печени (тетрациклин и парацетамол соответственно); по осям ординат — исследованные показатели. Вертикальные отрезки — 95% доверительные интервалы

новорожденных intactных крысят. Исключение составили животные группы T1, у которых данный показатель превысил таковой в контроле (см. таблицу). Анализ величины клеточного индекса позволил констатировать его значимое снижение у животных всех подопытных групп. Одним из наиболее чувствительных индикаторов состояния сперматогенеза является показатель, отражающий содержание ИСК со слущенным эпителием. У подопытных крысят всех групп количество таких ИСК значимо выше, чем в контроле (см. рисунок, в). Аналогичная закономерность выявлена и при анализе содержания в ИСК экспериментальных животных одно-, дву- и многоядерных клеток, в том числе гигантских клеток с фрагментированными и пикнотизированными ядрами (см. рисунок, г).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют констатировать, что у потом-

ства самок крыс с экспериментальным поражением печени токсического и лекарственного генеза имеет место нарушение антенатального развития сперматогенного эпителия, о чем свидетельствует, прежде всего, снижение суммарного количества сперматогенных клеток и изменение их субпопуляционного состава, а также увеличение числа канальцев со слущенным эпителием и в них гигантских сперматогенных клеток.

Согласно современным представлениям [7, 12], сустентоциты являются одним из важнейших компонентов, определяющих антенатальное и постнатальное развитие сперматогенного эпителия ИСК. Установлено, что сустентоциты обеспечивают структурное поддержание и питание сперматогенных клеток, фагоцитоз их дегенеративных форм, регулируют митотическую активность сперматогоний, секретируют ряд протеинов, в том числе андрогенсвязывающий белок, а также многочисленные цитокины, регулирующие развитие сперматогенных клеток на разных этапах онтогенеза [10, 12]. В этом плане заслуживают внимания

полученные нами данные, свидетельствующие о снижении у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза содержания в ИСК сустентоцитов. Логично предположить, что в результате уменьшения их содержания нарушается регуляция антенатального развития сперматогенных клеток у подопытных крысят. Это согласуется с полученными нами результатами, свидетельствующими о снижении суммарного содержания сперматогенных клеток и изменения их субпопуляционного состава у подопытных крысят.

Вместе с тем, репродуктивная система может блокироваться и опосредованно через гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему [1, 5, 9]. Ранее было установлено [1], что у потомства самок с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы происходит уменьшение площади мелкоклеточного (вентромедиального) и крупноклеточного (супраоптического) ядер

гипоталамуса, уменьшение размеров клеток этих ядер и плотности их расположения.

Проникновение из крови матери через плаценту в кровь плода токсических продуктов метаболизма, продуктов перекисного окисления, sensibilizированных лимфоцитов, а также антител обуславливает нарушение условий гисто-, орган- и системогенеза плода. Вместе с тем, основным компонентом стрессового синдрома является кортикотропин-релизинг-гормон, вырабатываемый клетками аркуатного ядра гипоталамуса, который способен непосредственно или через β -эндорфины подавлять выработку лютеинизирующего гормона аденогипофиза и приводить, в конечном итоге, к нарушению синтеза гормонов репродукции [9]. Наконец, процесс формирования половых клеток регулируется многоуровневой системой «гипоталамус—гипофиз—гонады», звенья которой тесно взаимосвязаны с механизмами положительных и отрицательных обратных связей. Нарушения последних могут приводить к развитию патологического процесса как в регулируемой системе, так и в организме в целом [11].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что у самок крыс с экспериментальным поражением печени рождается потомство с нарушенным «стартом репродуктивного здоровья».

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова А.Б. и Брюхин Г.В. Морфофункциональные изменения нейросекреторных клеток гипоталамуса у потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Актуальные проблемы морфологии, 2006, вып. 5, с. 94–96
2. Кулаков В.И., Серов В.Н., Адамян Л.В. и др. Руководство по охране репродуктивного здоровья. М., Триада-Х, 2001.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., МедиаСфера, 2006.
4. Саркисов Д.С. и Ремизов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. М., изд. Ин-та хирургии им. А.М.Вишневского АМН СССР, 1960.
5. Стадников А.А. Гипоталамические факторы регуляции процессов роста, пролиферации и цитодифференцировки эпителия аденогипофиза. Екатеринбург, Изд-во Уро. РАН, 1999.

6. Ухов Ю.И. и Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. Арх. анат., 1983, т. 84, вып. 3, с. 66–69.
7. Шевлюк Н.Н. и Стадников А.А. Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции). Оренбург, Изд-во ОрГМА, 2010.
8. Carlsen E., Giwercman A., Keiding N. et al. Evidence of decreasing quality of semen during the past 50 years. Brit. Med. J., 1992, v. 305, p. 609–613.
9. Chronos G.P. and Gold P.W. The concepts of stress and system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. J.A.M.A., 1992, v. 267, № 9, p. 1244–1252.
10. Okuma V., Saito K., Connor A.E. et al. Reciprocal regulation of activin A and inhibin B by interleukin-1 (IL1) and follicle-stimulating hormone (FSH) in rat Sertoli cells in vitro. J. Endocrinol., 2005, v. 185, p. 99–110.
11. Rivier C. and Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. Biol. Reprod., 1991, v. 45, p. 523–532.
12. Stephan J.P., Syed V. and Jegou B. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. Mol. Cell. Endocrinol., 1997, v. 134, p. 109–118.

Поступила в редакцию 07.01.2013

Получена после доработки 09.12.2013

CHARACTERISTICS OF THE SPERMATOGENIC EPITHELIUM IN THE TESTIS OF NEWBORN RATS — THE OFFSPRING OF FEMALE RATS WITH CHRONIC LIVER INJURY OF VARIOUS GENESIS

M.L.Sizonenko and G.V.Briukhin

The effect of chronic injury of hepatobiliary system of various genesis in females rats on the formation of spermatogenic epithelium in the testis of their newborn offspring was studied. The models of toxic (CCl_4) and medicinal (tetracycline, paracetamol) liver injury were used. The state of the seminiferous epithelium was assessed on the serial histological sections of the testis with the use of the morphometric device. In experimental animals, a reduction of the diameter and the area of the seminiferous tubules (ST) was detected, associated with the decline of the total number of spermatogenic cells, spermatogonia of various generations, total number of spermatocytes and Sertoli cells. At the same time, in the newborn rats of all the experimental groups, the number of ST with the desquamated epithelium, and that one of the multinucleated spermatogenic cells with fragmented and pyknotic nuclei were increased.

Key words: *testis, spermatogenesis, maternal liver pathology*

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