

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 17, №4

2018



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 591.463.2:[577.114/115:579.842.21]-092.9

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Serratia marcescens* В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

© Поплавская Е.А., Поплавский Д.Ю., Хильманович Е.Н.

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80

Резюме

Цель. Изучение возможных структурных изменений в семенниках крыс на 3-и сутки после воздействия бактериального липополисахарида (ЛПС) *Serratia marcescens* (*S. marcescens*).

Методика. Самцам крыс вводили ЛПС *S. marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы внутривбрюшинно, однократно. Готовили парафиновые срезы, окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения ImageWarp (Bit Flow, США). Оценку достоверности изменения численных значений проводили с помощью непараметрической статистики с применением компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows.

Результаты. В результате исследования установлено, что на 3-и сутки после воздействия ЛПС *S. marcescens* в семенниках самцов крыс происходит развитие разнообразных структурных изменений: увеличение количества деструктивных семенных канальцев на срезе – в 2,9 раза ($p < 0,05$); отек межканальцевой стромы и увеличение диаметра перитубулярных гемокапилляров – на 37,17% ($p < 0,05$), уменьшение количества интерстициальных эндокриноцитов и снижение площади их ядер – на 24,42% ($p < 0,05$) и на 20,70% ($p < 0,05$) соответственно; в извитых семенных канальцах – уменьшение количества sustentocytov и снижение площади их ядер на 25,92% ($p < 0,05$) и на 17,27% ($p < 0,05$) соответственно, а также уменьшение количества клеток сперматогенного эпителия – сперматогоний и сперматоцитов на 24,01% ($p < 0,05$) и на 21,85% ($p < 0,05$) соответственно.

Заключение. Сделан вывод, что в ранние сроки после воздействия липополисахарида *Serratia marcescens* происходит ряд структурных изменений в семенниках крыс: увеличение количества деструктивных семенных канальцев на срезе, отек межканальцевой стромы и увеличение диаметра перитубулярных гемокапилляров, уменьшение количества клеток и снижение площади их ядер, которые могут свидетельствовать о замедлении процессов пролиферации и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия, приводящих к нарушению их функций, и, в конечном итоге, к нарушению сперматогенеза и функции органа в целом.

Ключевые слова: липополисахариды, семенник, сперматогенез, крысы

STRUCTURAL FEATURES OF THE RATS TESTES ON EXPOSURE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE *Serratiamarcescens* IN EARLY TIMES FOLLOWING EXPOSURE

Poplavskaja E.A., Poplavskij D.Ju., Hilmanovich E.N.

Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus

Abstract

Objective. To study the influence of bacterial lipopolysaccharide *Serratia marcescens*, administered to male rats, on the structure of the testes in early terms following exposure.

Methods. Male rats were once injected LPS *S. marcescens* at a dose of 50 mg/kg of mass intraperitoneally. Paraffin sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Studies of histological specimens, their microphotography, morphometry were carried out at different magnifications of the Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, Germany), the Leica DFC 320 digital camera

(Leica Microsystems GmbH, Germany) and the ImageWarp image analysis software (Bit Flow, USA). Evaluation of the reliability of changes in numerical values was carried out using nonparametric statistics of the computer program Statistica 6.0 for Windows.

Results. As a result of the study, it was established that on the 3rd day after exposure to LPS *S. marcescens* in the testes of male rats, the following structural changes developed: an increase in the number of destructive seminiferous tubules on the cut by 2.9 times ($p < 0.05$); swelling of the interstitial stroma and an increase in the diameter of peritubular hemocapillaries by 37.17% ($p < 0.05$), a decrease in the number of interstitial endocrinocytes and a decrease in the area of their nuclei by 24.42% ($p < 0.05$) and by 20, 70% ($p < 0.05$), respectively; in the convoluted seminiferous tubules - a decrease in the number of sustentocytes and a decrease in the area of their nuclei by 25.92% ($p < 0.05$) and by 17.27% ($p < 0.05$) respectively, as well as a decrease in the number of spermatogenic epithelium cells – spermatogonia and spermatocytes by 24.01% ($p < 0.05$) and by 21, 85% ($p < 0.05$), respectively.

Conclusion. It was concluded that in the testes of male rats a variety of structural changes occurs: an increase in the number of destructive seminiferous tubules on the cut; swelling of the interstitial stroma and an increase in the diameter of peritubular hemocapillaries, a decrease in the number of interstitial endocrinocytes and a decrease in the area of their nuclei; in the convoluted seminiferous tubules - a decrease in the number of sustentocytes and reduction of the area of their nuclei, as well as a decrease in the number of cells of spermatogenic epithelium.

Keywords: lipopolysaccharide, testes, spermatogenesis, rats

Введение

Сперматогенез является одним из наиболее динамичных процессов в организме млекопитающих животных и человека. Это сложный многостадийный процесс роста, созревания и формирования сперматозоидов из незрелых половых клеток, протекающий под контролем специфических генов и регулирующий совокупностью гормонов, цитокинов и факторов роста [3, 16]. Нормальное его протекание требует скоординированного влияния многочисленных факторов – генетических, клеточных, гормональных и др. Подобная сложность делает сперматогенез «легкой мишенью» для всякого рода негативных воздействий.

Влиянию различных факторов на сперматогенез посвящено много работ. Установлено, что мужская репродуктивная система уязвима не только к действию факторов внешней среды, но и чувствительна к влияниям химических веществ, повышенной медикации, злоупотреблению алкоголем [6, 11, 14]. В многочисленных работах, как клинических, так и экспериментальных, объясняются различные нарушения дифференцировки и созревания полового эпителия, повышенной чувствительностью сперматогенного эпителия к разного рода агентам. Из химических факторов особое внимание уделяется разнообразным соединениям, имитирующими эффекты эстрогенов или являются лигандами рецепторов андрогенов. Они способны вмешиваться в естественные пути эндокринной регуляции процессов гамето- и стероидогенеза. К веществам с указанным действием относят эстрогены растительного происхождения – фитоэстрогены, попадающие в организм с продуктами питания, а так же разнообразные искусственно созданные химические соединения – циклические ароматические углеводы, полихлорированные бифенилы, диоксины и прочие [1, 5, 6, 15]. Известно, что сперматогенные клетки на разных стадиях созревания имеют неодинаковую чувствительность к воздействию агентам. Например, бисульфид и прокарбазин влияют на сперматогонию, 2-метоксиэтанол – на сперматоциты, метила хлорид – на сперматиды, 1,3-динитробензол и 2,5-гексанедион – на sustentоциты. Увеличение их доз приводит к поражению сперматогенных клеток на всех стадиях созревания и нарушению регуляторных механизмов, приводящих к бесплодию [7, 9]. Ткань семенников весьма чувствительна и к действию многих химиотерапевтических препаратов, применяющихся при лечении рака, препаратам контрацепции, препаратам, используемых для коррекции недостаточной функции мужских половых желез (импотенция, климактерические нарушения) и др. [4, 13].

Бактериальные липополисахариды (ЛПС) являются постоянным структурным компонентом клеточных мембран грамотрицательных бактерий. Интерес к липополисахаридам обусловлен не только их уникальной структурой и весьма широким разнообразием вызываемых эффектов, но и тем, что организм человека постоянно контактирует с достаточно большим количеством этого токсина, что обеспечивает поддержание гомеостаза, адаптацию организма к стрессовым воздействиям, способствует предотвращению проникновения потенциально патогенной флоры в кровотоки, стимулируют иммунитет и неспецифическую резистентность организма, при этом, обладая выраженным токсическим эффектом [2, 10]. Однако влияние бактериальных липополисахаридов на структуру семенников практически не изучено.

Учитывая вышеизложенное, была поставлена цель – изучить возможные структурные изменения в семенниках крыс на 3-и сут. после воздействия бактериального липополисахарида *Serratia marcescens*.

Методика

Объектом исследования являлись половозрелые самцы беспородных белых крыс. Агентом воздействия – липополисахарид *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), производства фирмы «Sigma», США. В эксперименте было использовано 12 самцов беспородных белых крыс. Масса самцов составляла 230 ± 30 граммов. Все животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, на одинаковом пищевом рационе в соответствии с нормами содержания лабораторных животных, 12/12-часовом ритме освещения и темноты с соблюдением требований, изложенных в Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными. Все этапы исследования проводились с разрешения комиссии по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Из самцов были сформированы одна опытная и одна контрольная группы. Самцам опытной группы вводили ЛПС *S. marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы внутривентриально однократно. Самцам контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентном количестве. Самцов экспериментальных групп на 3-и сут. после воздействия ЛПС *S. marcescens* усыпляли парами эфира с последующей декапитацией. Животных вскрывали и выделяли семенники. Одну часть семенников фиксировали в жидкости Карнуа, готовили парафиновые срезы, толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. На окрашенных гистологических препаратах определяли количество деструктивных семенных канальцев на срезе, диаметр перитубулярных гемокпилляров в межканальцевой строме, подсчитывали количество интерстициальных клеток в поле зрения и определяли площадь их ядер, количество сустентоцитов на срезе канальца и определяли площадь их ядер, подсчитывали количество сперматогоний и сперматоцитов на срезе канальца. Иллюстративный материал получали с помощью цифровой фотокамеры Leica DFC 320 в комплексе с микроскопом Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Германия).

Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы семенников от сравниваемых контрольных и опытных животных обрабатывали параллельно в одинаковых условиях. Погрешность измерений составила менее 5%. В результате морфометрических исследований получены количественные непрерывные данные. Их обрабатывали с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер 31415926535897) с применением описательной статистики. Для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования

Экспериментально установлено, что у самцов, получавших ЛПС *S. marcescens*, относительное количество канальцев с деструктивными изменениями было статистически достоверно увеличено в 2,9 раза ($Z = -2,73$, $p = 0,006$) по сравнению с контрольными показателями (рис. 1, табл. 1).

В семенниках опытных животных при однократном внутривентриальном введении ЛПС *S. marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы наблюдалась отечность межканальцевой стромы и уменьшение количества интерстициальных клеток по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. Их количество на 3-и сут. после воздействия у крыс опытной группы статистически достоверно снижено по сравнению с таковым в контроле на 24,42% ($Z = 2,61$, $p = 0,00$) (табл. 1). Интерстициальные эндокриноциты опытной группы отличались полиморфизмом, располагались преимущественно группами, имели отростчатую или овальную форму. Причем для многих клеток было характерно снижение оксифильных свойств, сопровождаемое иногда микровакуолизацией цитоплазмы. Ядра клеток, как показали данные морфометрии, уменьшены в размере на 20,70% ($Z = 1,96$, $p = 0,04$), результаты при этом статистически достоверны (табл. 1).

Перитубулярные гемокпилляры в семенниках животных опытной группы были расширены. В некоторых наблюдался гемостаз и лейкоцитарная инфильтрация. Установлено, что их диаметр статистически достоверно увеличивался на 37,17% ($Z = 2,12$, $p = 0,03$) по сравнению с таковым в контроле (табл. 1).

В опытной группе на светооптическом уровне в сустентоцитах наблюдаются выраженные

морфологические изменения, заключающиеся в вакуолизации цитоплазмы клеток, в отдельных участках канальца наблюдается гибель клеток (рис. 2).

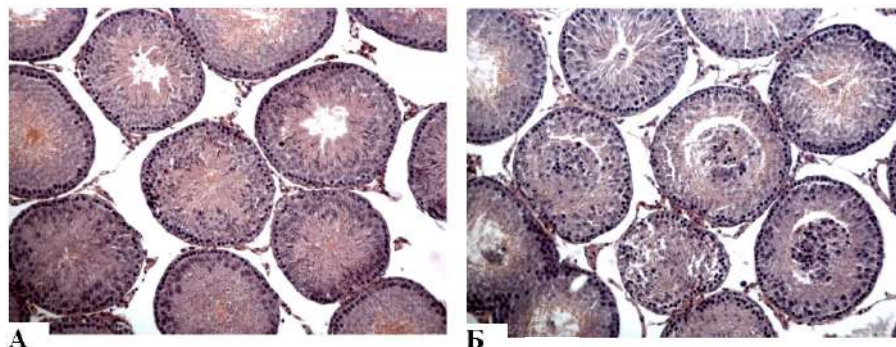


Рис. 1. Строение извитого семенного канальца у контрольных животных (А) и у крыс на 3-и сутки после однократного внутрибрюшинного введения ЛПС *S. marcescens* (Б). Увеличение количества деструктивных семенных канальцев в семенниках у крыс в опытной группе. Цифровая микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Ч100.

Таблица 1. Структура семенников у самцов крыс в контрольной группе и на 3-и сутки после воздействия ЛПС *S. marcescens* (Me (Q₁; Q₂))

Исследуемые показатели	Контроль	Опыт
Количество деструктивных семенных канальцев	8,05 (0,16; 0,33)	23,48*(21,21; 25,13)
Диаметр перитубулярных гемокапилляров, мкм	10,76 (10,14; 11,71)	14,76*(14,51; 15,63)
Количество интерстициальных эндокриноцитов	8,23 (8,07; 8,38)	7,09*(6,48; 7,20)
Площадь ядер интерстициальных эндокриноцитов, мкм ²	23,76 (23,57; 24,65)	18,84*(15,59; 23,45)
Количество sustentоцитов	48,67 (46,22; 50,70)	40,26*(40,14; 40,65)
Площадь ядер sustentоцитов, мкм ²	48,67 (46,22; 50,70)	40,26*(40,14; 40,65)
Количество сперматогоний	51,00 (51,00; 52,00)	38,75*(37,10; 40,40)
Количество сперматоцитов	41,63 (40,74; 42,21)	32,53*(28,23; 32,54)

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Экспериментально установлено, что при введении ЛПС *S. marcescens* наблюдается статистически достоверное снижение количества sustentоцитов в извитых семенных канальцах семенников на 25,92% ($Z=2,40$, $p=0,01$) (табл. 1). Данные морфометрии показали и уменьшение площади их ядер на 17,27% ($Z=2,12$, $p=0,03$) (табл. 1, рис. 2).

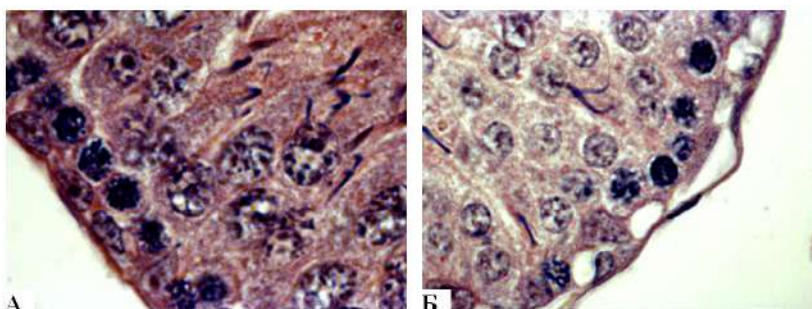


Рис. 2. Sustentоциты в семенных канальцах семенников у крыс контрольной группы (А), и у крыс на 3-и сут. после однократного внутрибрюшинного введения ЛПС *S. marcescens* (Б). Вакуолизация цитоплазмы и снижение количества sustentоцитов в семенниках у крыс в опытной группе. Цифровая микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Ч1000

В результате проведенных исследований установлено, что при введении ЛПС *S. marcescens* происходит статистически достоверное снижение среднего количества нормальных

сперматогоний на 3-и сут. после воздействия по сравнению с контрольными показателями, которое составляет 24,01% ($Z=2,73$, $p=0,00$) (табл. 1, рис. 3). При этом наблюдаются явления вакуолизации цитоплазмы сперматогоний. Данные морфометрического анализа показали и значительное снижение количества сперматозоидов в канальцах семенников у животных опытных групп, по сравнению с таковым в контроле на 21, 85% ($Z=1,98$, $p=0,04$) (табл. 1, рис. 3).

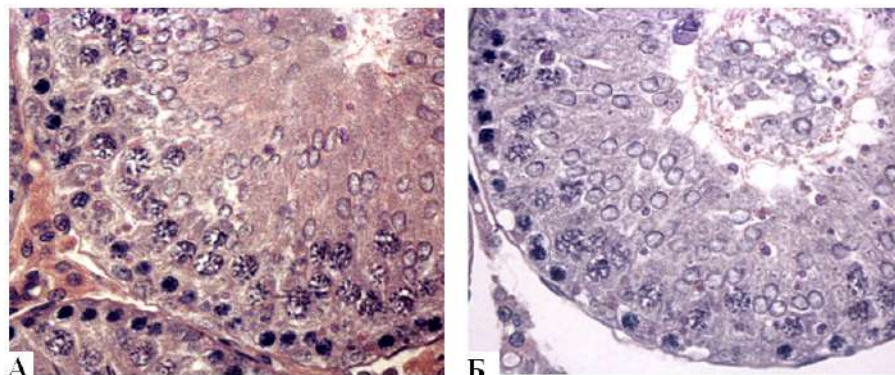


Рис. 3. Количество сперматогоний и сперматозоидов в канальце у контрольных крыс (А) и у крыс на 3-и сут. после однократного внутрибрюшинного введения ЛПС *S. marcescens* (Б). Уменьшение количества сперматозоидов в семенниках у крыс в опытной группе. Цифровая микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Ч200

Обсуждение результатов исследования

Результаты проведенного исследования позволяют констатировать, что введение бактериального липополисахарида *S. marcescens* самцам крыс вызывает развитие разнообразных структурных изменений в ткани семенников опытных животных в ранние сроки после воздействия. В семенниках самцов крыс в 2,9 раза возрастает количество извитых семенных канальцев с деструктивными изменениями. Наблюдается отёчность межканальцевой стромы и увеличение в ней на 37,17% диаметра гемокapилляров. Происходит уменьшение на 24,42% числа интерстициальных эндокриноцитов и снижается площадь их ядер на 20,70%. В извитых семенных канальцах семенников опытных животных уменьшается количество sustentоцитов на 25,92% и происходит снижение площади их ядер на 17,27%. А также наблюдается снижение количества сперматогоний и сперматозоидов в извитых канальцах семенников животных опытной группы на 24,01% и на 21,85% соответственно. Поскольку установлено, что sustentоциты играют важную роль в обеспечении сперматогенеза [8], логично предположить, что в результате уменьшения их количества в извитых семенных канальцах его регуляция нарушается. Кроме того, установлено, что структурные изменения в семенниках животных сопровождаются и нарушениями метаболизма в клетках сперматогенного эпителия [11, 12].

Все вышеуказанные изменения в семенниках крыс опытных животных могут свидетельствовать о замедлении пролиферации и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия, приводящие к нарушению их функций, и в конечном итоге – к нарушению сперматогенеза и функции органа в целом.

Выводы

1. Введение бактериального ЛПС *S. marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы внутрибрюшинно, однократно самцам крыс в ранние сроки после воздействия вызывает ряд структурных изменений в семенниках крыс: увеличение количества деструктивных семенных канальцев на срезе, отек межканальцевой стромы и увеличение диаметра перитубулярных гемокapилляров, уменьшение количества клеток и снижение площади их ядер.
2. Структурные изменения в семенниках крыс, вызванные введением ЛПС *S. marcescens*, приводят к замедлению процессов пролиферации и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия, нарушению их функций, и, в конечном итоге, к нарушению сперматогенеза и функции органа в целом.

Литература (references)

1. Андрусихина И.Н. Морфофункциональные изменения сперматогенеза при воздействии свинца и кадмия на самцов белых крыс // Промышленная токсикология. – 1999. – №2. – С. 22-26. [Andrusishina I.N. *Promyishlennaya toksikologiya*. Industrial Toxicology. – 1999. – N2. – P. 22-26. (in Russian)]
2. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – №3. – С. 98-105. [Bondarenko V.M., Rjabichenko E.V., Vetkova L.G. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii* Journal microbiology, epidemiology and immunobiology. – 2004. – N3. – P. 98-105. (in Russian)]
3. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2000. – №1. – С. 6-13. [Bykov V.L. *Problemy reprodukcii* Problems of reproduction. – 2000. – N1. – P. 6-13. (in Russian)]
4. Гольдберг Е.Д., Боровская Т.Г. Гонадотоксические эффекты противоопухолевых препаратов.-Томск: STT, 2000. – 110 с [Gol'dberg E.D., Borovskaja T.G. *Gonadotoksicheskie efektyi protivoopuholevyih preparatov*. Gonadotoxic effects of anticancer drugs. – Tomsk: STT, 2000. – 110 p. (in Russian)].
5. Дуденкова Н.А., Шубина О.С. Изменения морфофункционального состояния и продуктивности семенных желез белых крыс при воздействии ацетата свинца // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10 (Ч.6). – С. 1253-1259. [Dudenkova N.A., Shubina O.S. *Fundamentalnyie issledovaniya*. Basic research. – 2013. – N10(Part.6), – P. 1253-259. (in Russian)]
6. Карташев А.Г. Влияние хронических факторов в постнатальном онтогенезе животных. – Томск: В-Спектр. 2010. – 116 с. [Kartashev A.G. *Vliyanie hronicheskikh faktorov v postnatalnom ontogeneze zhivotnyih*. The influence of chronic factors in the postnatal ontogenesis of animals. – Tomsk: V-Spectrum, 2010. – 116 p. (in Russian)]
7. Кидун К.А., Солодова Е.К., Угольник Т.С., Дорошенко Р.В. Стресс-индуцированные изменения антиоксидантного статуса сперматозоидов и морфологии семенников крыс // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – №2(40). – С.119-125. [Kidun K.A., Solodova E.K., Ugol'nik T.S., Doroshenko R.V. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. Problems of health and ecology. – 2014. – N2 (40). – P.119-125. (in Russian)]
8. Курляндский Б.А., Филова В.А. Общая токсикология: под общ. ред. Б.А. Курляндского, Филовой В.А. – М.: Медицина. 2002. – 608 с [Kurljanskij B.A., Filova V.A. *Obshhaja toksikologija: pod obshh. red. B.A. Kurljanskogo, Filovoj V.A.* General toxicology. under total ed. B.A. Kurlyandskogo, Filovoy V.A. – Moscow: Medicine. 2002. – 608 p. (in Russian)]
9. Лиходед В.Г., Ющук Н.Д., Яковлев М.Ю. Роль эндотоксинов грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии // Архив патологии. – 1996. – №2. – С. 8-13 [Lihoded V.G., Jushhuk N.D., Jakovlev M. JU. *Arhiv patologii*. Pathology Archive. – 1996. – N2. – P. 8-13. (in Russian)]
10. Никитин А.И. Факторы среды и репродуктивная система человека. //Морфология. – 1998. – №6. – С. 7-16. [NikitiNA.I. *Morfologija*. Morphology. – 1998. – N6. – P. 7-16. (in Russian)]
11. Поплавская Е.А., Лис Р.Е. Влияние бактериальных липополисахаридов грамотрицательных бактерий, *E.coli* u *S. marcescens*, введенных самцам крыс, на активность ферментов в цитоплазме сперматоцитов 1-го порядка на 1,3,6 сутки после введения // Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2014. – №4. – С. 81-85. [Poplavskaja E.A., Lis R.E. *Izvestija Nacional'noj Akademii Nauk Belarusi. Serija biologicheskikh nauk*. News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Biological Sciences. – 2014. – N4. – P. 81-85. (in Russian)]
12. Разниченко А.Г. Влияние химио- и радиотерапии на сперматогенез у онкологических больных // Проблемы репродукции. – 2007. – №4. – С. 70-75. [Raznichenko A.G. *Problemy reprodukcii*. Problems of reproduction. – 2007. – N4. – P. 70-75. (in Russian)]
13. Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis // Journal of the National Cancer Institute Monographs. – 2005. – N34. – P. 6-8.

Информация об авторах

Поплавская Елена Александровна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета. Республика Беларусь. E-mail: Len.poplavska@mail.ru

Поплавский Денис Юрьевич – студент лечебного факультета Гродненского государственного медицинского университета. Республика Беларусь. E-mail: denispoplavski@gmail.com

Хильманович Евгения Николаевна – студентка педиатрического факультета Гродненского государственного медицинского университета. Республика Беларусь. E-mail: jenny-gr@yandex.ru