



ISSN 1810-5033

2/2016

НОВОСТИ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
НАУК

NEWS
OF BIOMEDICAL
SCIENCES

ISSN 1810-5033

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

Научно-практический и научно-теоретический журнал

Издается с января 2001 года

Published since January, 2001

Выходит четыре раза в год

Published quartely

*Verba volant,
scripta manent*

2016, Т. 13, № 2

Минск



УДК 591.463:[618.3-06:616.36-008.811.6]-092.9

Я. Р. МАЦЮК, Е. Ч. МИХАЛЬЧУК

РЕПРОДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА МАТЕРИ*Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь*

Исследования проведены на 20 беспородных белых крысах-самках массой 200–220 г и 20 самцах массой 330–350 г. 14 самцов из 20 развивались в условиях экспериментально моделируемого на 17 день беременности подпечёночного обтурационного холестаза. С применением соматометрического, гистологического, морфометрического и статистического методов исследования установлено, что оплодотворяющая способность самцов, развивающихся в условиях холестаза матери, резко снижена и составляет 42,9%. Патогенетическим фактором этого процесса являются деструктивные изменения в семенниках, сопровождающиеся нарушением или полной остановкой сперматогенеза.

Ключевые слова: холестаз беременных, самцы, репродуктивные свойства.

Введение. Клиническими и экспериментальными исследованиями установлено отрицательное воздействие холестаза матери на потомство [2, 8–10]. У последнего в постнатальном периоде наблюдаются задержка прироста массы, физического развития, снижение неспецифической резистентности, жизнеспособности и торможение органогенеза [3, 5, 6, 8]. Механизм этого явления сложен и окончательно не выяснен. Предполагается, что вышеуказанные изменения обусловлены воздействием эндогенной интоксикации, развивающейся при холестазе в материнском организме [7, 11, 12]. Особенно негативно это сказывается на органах половой системы потомства, даже при достижении ими половой зрелости [1, 4]. Несмотря на то, что к этому возрастному периоду масса семенников у опытных животных достигает контрольного уровня, межканальцевая строма яичек остается отечной, содержание в ней интерстициальных клеток снижено. Вокруг извитых семенных канальцев уменьшено число перитубулярных капилляров, в стенке которых увеличено количество гликопротеинов, что может свидетельствовать о нарушении в семенниках гематотестикулярного барьера. В семенных канальцах уменьшена ширина эпителиосперматогенного слоя за счет сниженного количества сперматогенных клеток. При этом указанные нарушения имеют стабильный характер и с возрастом практически не нивелируются. Повлияют ли они на репродуктивные свойства потомства – неизвестно. Вышеизложенное послужило целью настоящего исследования, имеющего не только научную и прикладную, но и социальную значимость.

Материалы и методы. Исследования проведены на 20 половозрелых самках белых крыс массой 200–220 г и 20 самцах массой 330–350 г. Из них 14 самцов развивались в условиях холестаза матери, экспериментально моделируемого в период активного фетогенеза (17 день беременности). Остальные 6 самцов, как и все самки, развивались в обычных условиях вивария. В вечернее время самцов подсаживали к самкам из расчета один к одному в клетке. Самцы, развивавшиеся в условиях холестаза и спариваемые с обычными самками, составили опытную группу, а самцы и самки, развивавшиеся в стандартных условиях вивария – контрольную.

В утренние часы у всех самок после подсадки брались влагалищные мазки и день обнаружения в них спермиев считали первым днем беременности. Пары, при установлении у них факта беременности, выводились из опыта. Это обычно происходило после одной–трех подсажек. В случае отсутствия во влагалищных мазках спермиев подсадка продолжалась в течение трех недель, притом с заменой в парах самок. Последнее давало возможность удостовериться в неспособности оплодотворения со стороны самцов.

Самки опытной и контрольной групп находились под тщательным наблюдением, взвешивались на 1, 10, 17 и 21 дни беременности. Определялась длительность беременности и подсчитывалось число родившихся в помете. Новорожденные крысята опытных и контрольных групп взве-

шивались, изучалось их физическое развитие и по достижению 15-, 45- и 90-суточного возраста умерщвлялись в парах эфира.

С целью определения причин стерильности опытных самцов у них и у самцов контрольной группы забирали семенники, которые после взвешивания и фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин по принципу «контроль-опыт». Изготовленные парафиновые срезы толщиной 5 мкм после окрашивания гематоксилином и эозином использовались для гистологических и морфометрических исследований.

Изучение гистологических препаратов и получение иллюстрированного материала осуществлялись при разных увеличениях микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC 320 (Leica Microsystems, Gmb H, Германия) с использованием программы Image Warp (Bit Flow, USA). Полученные при этом цифровые данные подвергались параметрическому анализу с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,005$). Эксперимент проводился с соблюдением требований, изложенных в Хельсинской декларации о гуманном отношении к лабораторным животным.

Результаты и их обсуждение. Проведенными исследованиями установлено, что в контрольной группе в течение одной–двух подсадок самцов к самкам наступала 100% оплодотворяемость. В опытной группе, в результате трех подсадок самцов, развивающихся в условиях холестаза матери, экспериментально моделируемого на 17 сутки беременности, оплодотворяемость из 14 пар наблюдалась лишь у 6, что составило 42,9%. Оставшихся восемь опытных самцов продолжали подсаживать к обычным самкам, которые каждый раз менялись в парах на протяжении трех недель. Однако положительного эффекта в плане оплодотворения так и не наблюдалось.

Проведенный соматометрический анализ показал, что опытные самцы, проявляющие оплодотворяющую способность (ОПЛ+), были незначительно меньшей массы ($344,6 \pm 33,2$ г), чем самцы, не проявляющие (ОПЛ–) ($351,0 \pm 41,9$ г). Статистически недостоверна была и разница в массе семенников. У самцов, сохранивших оплодотворяющую способность, масса органов составила $1,45 \pm 0,13$ г, а у не сохранивших – $1,39 \pm 0,18$ г.

При изучении гистологических препаратов семенников самцов контрольной и опытной групп с последующей морфометрией, данные которой представлены в табл. 1, установлено, что в семенниках самцов, развивавшихся в плодный и ранний постнатальный периоды в условиях холестаза матери, имеет место выраженная отечность межканальцевой соединительнотканной стромы. В последней уменьшено количество интерстициальных клеток (из расчета на поле зрения, ув. $\times 400$). При этом они отличались полиморфизмом – от округлых до отросчатых форм и размерами. Наряду в них наблюдались явления микровакуолизации не только цито-, но и кариоплазмы, что снижало их тинкториальные свойства. Исчезала выявляемая в цитоплазме интерстициальных клеток семенников контрольных самцов и оксифильная зернистость. Уменьшались размеры ядер и их базофильные свойства.

Ввиду отечности межканальцевой стромы в семенниках уменьшалось плотность расположения извитых семенных канальцев, а вокруг них не только число кровеносных капилляров, но и их просвет (табл. 1). Притом многие семенные канальцы отличались прямолинейностью, что свидетельствует о задержке процесса их спирализации. В таких канальцах местами отсутствовали даже сперматогонии, а если они и выявлялись, то были единичными и неупорядоченно расположенными (рисунок, А).

Проведенным морфометрическим анализом установлено не только сужение диаметра извитых семенных канальцев, но и уменьшение в них ширины эпителиосперматогенного слоя, а в нем количества ярусов развивавшихся сперматогенных клеток (табл. 1, рисунок, А, Б). Последнее произошло за счет уменьшения почти в два раза числа сперматогоний, в три раза сперматоцитов I и II порядка. Встречались в канальцах участки, где сперматогонии вообще отсутствовали. Проявлялась тенденция к уменьшению диаметра их ядер. Довольно часто между сперматогенными клетками на разных уровнях в эпителиосперматогенном слое семенных канальцев наблюдались расширения межклеточных пространств, что, вероятно, способствовало ослаблению межклеточных контактов и отслоению находившихся на разных стадиях развития сперматогенных клеток и скоплению их в просвете канальцев, где они подвергались деструктивным, вплоть до некротических изменениям. Встречались и совершенно пустые семенные канальцы, в которых выявлялась лишь собственная соединительнотканная оболочка. Очень редко наблюдались канальцы, в просвете которых обнаруживались немногочисленные спермии (рисунок, Б).

Табл. 1. Морфометрические показатели структур семенников половозрелых крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Холестаз
Число интерстициальных клеток в поле зрения (ув. 400)	9,16±0,58	5,69±0,63*
Диаметр их ядер, мкм	6,26±0,14	5,65±0,05***
Число перитубулярных капилляров в поле зрения (ув. 400)	3,24±0,18	1,70±0,20***
Их диаметр, мкм	7,20±0,28	6,45±0,15*
Семенные каналцы		
Количество в поле зрения (ув. 200)	7,29±0,18	5,45±0,05***
Их диаметр, мкм	213,00±2,90	142,00±34,20
Толщина в канальце эпителиосперматогенного слоя, мкм	68,25±1,05	38,00±2,44***
Количество в нем ярусов сперматогенных клеток	6,12±0,21	2,35±0,86***
Число сперматогоний в канальце	72,40±1,51	36,00±12,00**
Диаметр их ядер, мкм	5,33±0,13	4,90±0,20
Число сперматоцитов I порядка	63,74±1,06	22,40±10,20***
Диаметр их ядер, мкм	7,39±0,12	6,65±0,25
Число сперматоцитов II порядка	77,53±2,49	24,90±1,69**
Диаметр их ядер, мкм	5,48±0,11	5,00±0,30
Число sustentоцитов в канальце	7,29±0,30	5,60±0,90
Диаметр их ядер, мкм	7,41±0,11	6,80±0,30

Примечание: различия показателей достоверны – * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

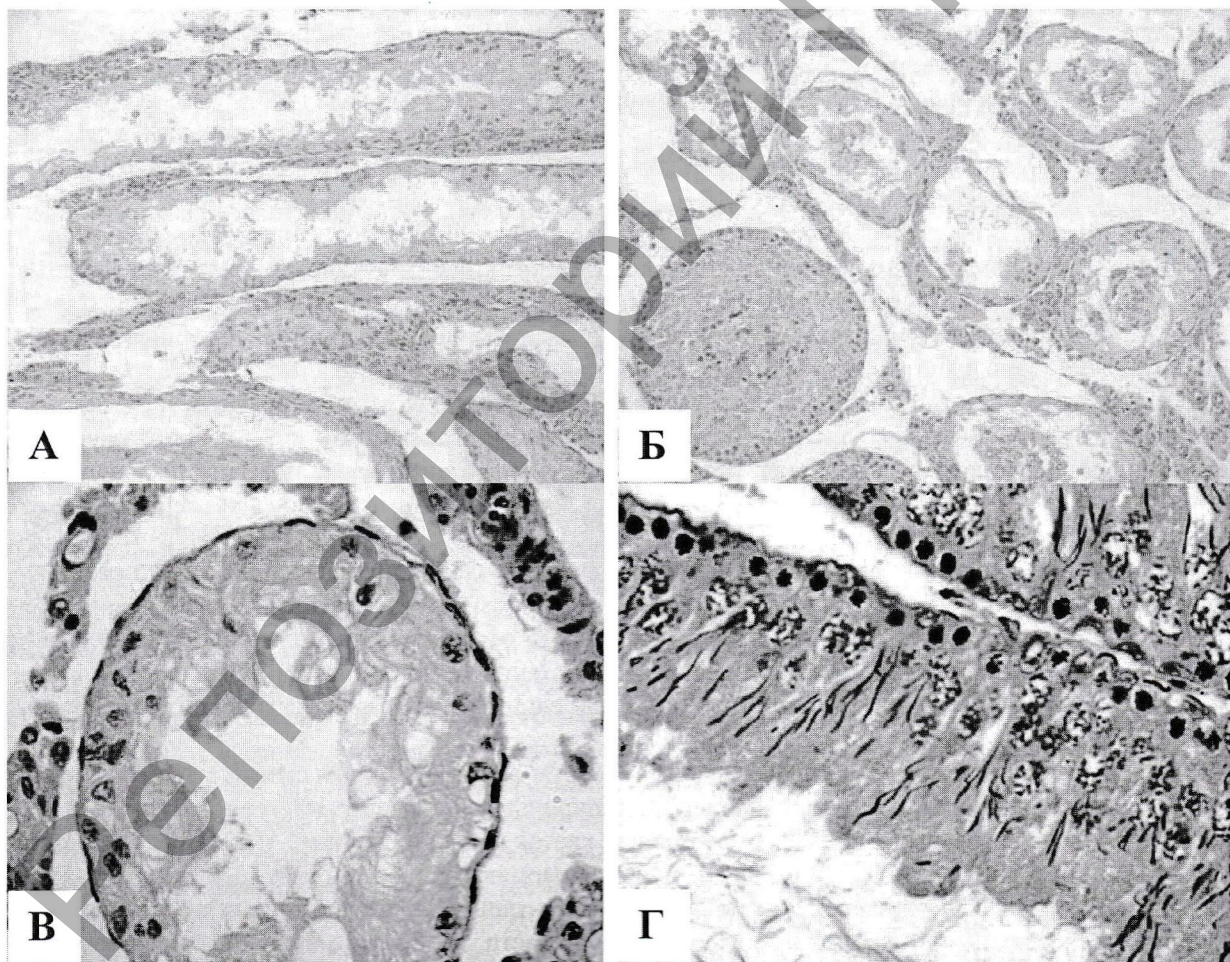


Рисунок. Общий вид семенных каналцев семенников половозрелого потомства крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери. Окраска гематоксилином и эозином.

А. Отечность интерстиция и прямолинейность семенных каналцев. Б. Полиморфизм структуры семенных каналцев с отсутствием и наличием сперматогенных клеток и скоплением их в просвете. Ув. $\times 100$. В. Кариопикноз, рексис ядер макро- и микровакуолизация карио- и цитоплазмы sustentоцитов. Г. Фрагмент каналца с проявляющимся процессом сперматогенеза. Ув. $\times 400$.

Было значительно меньшим на поле зрения и количество, как канальцев, так и число в них sustentocитов, хотя диаметр их ядер существенно не отличался от такового в контроле. Он был достоверно снижен в sustentocитах самцов, не проявлявших способности к оплодотворению.

Табл. 2. Особенности структуры семенников половозрелых самцов, развивавшихся в условиях холестаза матери в зависимости от оплодотворяющей способности ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Опыт	
		ОПЛ+	ОПЛ-
Число интерстициальных клеток в поле зрения (Ув. 400)	9,16±0,58	5,00±0,19	6,32±0,52
Диаметр их ядер, мкм	6,26±0,14	5,72±0,19	5,61±0,18
Число перитубулярных капилляров в поле зрения (Ув. 400)	3,24±0,18	6,30±0,62***	1,50±0,15
Их диаметр, мкм	7,20±0,28	6,62±0,44	1,91±0,21
Семенные канальцы			
Количество в поле зрения (Ув. 200)	7,29±0,18	5,43±0,37	5,55±0,29
Их диаметр, мкм	213,00±2,90	176,90±8,20***	108,30±8,30
Толщина в канальце эпителиосперматогенного слоя, мкм	68,25±1,05	50,83±2,44***	26,25±3,01
Количество ярусов сперматогенных клеток	6,12±0,21	3,29±0,36***	1,58±0,23
Число сперматогоний в канальце	72,40±1,51	48,31±3,88***	24,90±4,63
Диаметр их ядра, мкм	5,33±0,13	5,19±0,18	4,74±0,18
Число сперматоцитов I порядка	63,74±1,06	32,36±2,88*	12,24±2,26
Диаметр их ядер, мкм	7,39±0,12	6,43±0,13*	6,94±0,22
Число сперматоцитов II порядка	77,53±2,49	40,49±3,66***	7,84±1,65
Диаметр их ядер, мкм	5,48±0,11	4,75±0,12***	5,30±0,15
Число sustentocитов в канальце	7,29±0,30	6,50±0,25***	4,70±0,30
Диаметр их ядер, мкм	7,41±0,11	6,57±0,11	7,10±0,14

Примечание: различия показателей достоверны внутри опытной группы – * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$.

Заключение. Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что оплодотворяющая способность самцов, развивающихся в условиях холестаза матери, резко снижена. Последняя сохраняется лишь до определенного критического уровня развивающихся в семенниках структурных изменений, приводящих к нарушению или даже к полной остановке в канальцах процесса сперматогенеза.

Литература:

- [1] Мцпок Я. Р. // Фундам. проблемы морфологии: материалы междунар. конф., посв. 100-летию акад. П. Я. Герке. Минск. 2004. С. 70–72.
- [2] Мцпок Я. Р., Гудинович С. Я., Кизюкевич Л. С. // Весці НАН Беларусі : сер. мед. навук. 2008. № 2. С. 99–104.
- [3] Мцпок Я. Р., Михальчук Е. Ч., Зинчук В. В. и др. // Ж. ГрГМУ. 2010. № 2. С. 24–27.
- [4] Мцпок Я. Р., Барабан О. В., Емельянич С. В. // Весці НАН Беларусі: сер. мед. навук. Минск. 2010. № 1. С. 11–17.
- [5] Мцпок Я. Р., Михальчук Е. Ч. // Новости мед.-биол. наук. Патофизиология. 2012. Т. 5, № 2. С. 152–157.
- [6] Мцпок Я. Р., Чернышев Ю. Н. // Весці НАН Беларусі: сер. мед. навук. Минск. 2014. № 1. С. 63–68.
- [7] Мцпок Я. Р., Михальчук Е. Ч., Кот В. А. // Новости мед.-биол. наук. 2012. Т. 11, № 1. С. 15–19.
- [8] Михальчук Е. Ч., Мцпок Я. Р. // Ж. ГрГМУ. 2007. № 2. С. 43–45.
- [9] Негода В. В., Скворцова З. С., Скворцова В. В. // Лечащий врач. 2003. № 6. С. 58–61.
- [10] Шехтман М. М. Экстрагенитальная патология и беременность. М.: Медицина, 1987. 296с.
- [11] Bergane W., Cocheten R., Merviel C. end al. // Acta Obstet. Gynecol. Scand., 2000. Vol. 79. P. 941–946.
- [12] Reyes H. // Gastroenterol., 1992. Vol. 21. P. 905–921.

Поступила в редакцию: 15.01.2016 г.