

© ПОПЛАВСКАЯ Е.А., 2016

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ТКАНИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *S. MARCESCENS*

ПОПЛАВСКАЯ Е.А.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», г.Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2016. – Том 15, №4. – С. 18-24.

STRUCTURAL FEATURES OF THE INTERSTITIAL TISSUE OF THE RATS' TESTES ON EXPOSURE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE *S. MARCESCENS*

PAPLAUSKAYA E.A.

Educational Establishment «Grodno State Medical University», Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2016;15(4):18-24.

Резюме.

В работе экспериментально доказано, что при однократном внутрибрюшинном введении липополисахарида *Serratia marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы самцам крыс вызывает развитие разнообразных структурных изменений в интерстициальной ткани семенников опытных животных. При изучении гистологических препаратов семенников крыс опытных животных регистрируется отечность интерстиция и увеличение диаметра перитубулярных гемокапилляров. В некоторых гемокапиллярах наблюдается гемостаз и лейкоцитарная инфильтрация. Интерстициальные эндокриноциты животных опытной группы отличаются полиморфизмом, располагаются в интерстиции преимущественно группами и имеют отростчатую либо овальную форму. Цитоплазма клеток зачастую микровакуолизирована с неравномерно распределенной и разной по тинкториальным свойствам зернистостью. Кроме того, происходит уменьшение количества эндокринных клеток в интерстициальной ткани семенников опытных животных по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе, ядра клеток во все исследуемые сроки, как показали данные морфометрии, уменьшены в размере. Все вышеуказанные изменения в интерстициальной ткани семенников опытных животных сохраняются на протяжении довольно длительного периода после воздействия бактериального липополисахарида *Serratia marcescens* (3-и, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е и 50-е сутки после введения) и могут приводить к нарушению процессов сперматогенеза у животных.

Ключевые слова: бактериальный липополисахарид, семенник, интерстициальные эндокриноциты.

Abstract.

It has been experimentally proved in this work that a single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide *Serratia marcescens* in a dose of 50 mcg / kg of the body weight in male rats causes the development of a variety of structural changes in the interstitial tissue of the experimental animals testes. While studying histological preparations of the rats' testes in experimental animals, interstitial edema and an increase in the diameter of peritubular hemocapillaries are registered. In some hemocapillaries hemostasis and leukocytic infiltration are observed. Interstitial endocrinocytes of animals from the experimental group distinguish themselves by polymorphism, are located predominantly in the interstitial groups, and are stellate or oval in their form. The cellular cytoplasm is often microvacuolated with unevenly distributed, and different in tinctorial properties granularity. Furthermore, there is a decrease in the amount of endocrine cells in the testicular interstitial tissue of experimental animals in comparison with that in the control group, cellular nuclei in all investigated periods, according to morphometry data are reduced in size. All of the above-mentioned changes in the interstitial tissue of experimental animals testes persist over a fairly long period of time after exposure to bacterial lipopolysaccharide *Serratia marcescens* (3rd, 10th, 20th, 30th, 40th and 50th day after administration) and can lead to the disturbance of spermatogenesis processes in animals.

Key words: bacterial lipopolysaccharide, testis, interstitial endocrinocytes.

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 [1, 2, 3]. Нормальное его протекание требует скоординированного влияния многочисленных факторов - генетических, клеточных, гормональных и др. Подобная сложность делает сперматогенез «легкой мишенью» для всякого рода негативных воздействий.

Клетки Лейдига - один из компонентов интерстициальной ткани семенников, которые обладают эндокринной активностью. Секретируемые ими андрогены имеют многообразное метаболическое значение в организме на разных этапах онтогенеза. При этом ведущей функцией, которую осуществляют андрогены, является регуляция сперматогенеза [4]. Структурные изменения в интерстициальной ткани, несомненно, могут привести к нарушению процесса сперматогенеза и функции органа в целом. Известно влияние различных эндо- и экзогенных факторов на структуру семенников и интерстициальных эндокриноцитов, в частности, которые могут воздействовать на любое из звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [5, 6]. Из химических факторов особое внимание уделяется разнообразным соединениям, которые имитируют эффекты эстрогенов или являются лигандами рецепторов андрогенов. Эти соединения способны вмешиваться в естественные пути эндокринной регуляции процессов гаметогенеза и стероидогенеза. К веществам с указанным действием относят и естественные эстрогены растительного происхождения (фитоэстрогены), попадающие в организм с продуктами питания. Большую опасность представляют разнообразные искусственно созданные химические соединения, такие как компоненты топлива, соединения, образующиеся при сгорании нефтепродуктов – циклические ароматические углеводы, полихлорированные бифенилы, диоксины, эфиры фталата, обладающие эстрогенной и антиандрогенной активностью. Например, при действии этана диметан-сульфоната происходит разрушение интерстициальных эндокриноцитов [7].

В ходе различных клинических и экспериментальных исследований лучевой терапии,

которая проводилась у пациентов со многими заболеваниями, были обнаружены нарушения функций интерстициальных эндокринных клеток. После тотального облучения всего организма при лечении, в частности, острой лимфобластной лейкемии, наблюдается дисфункция клеток межканальцевого интерстиция. Ионизирующее излучение вызывает окислительный стресс в клетках и апоптоз [8].

Применение препаратов контрацепции, препаратов с андрогенной активностью, которые используются для коррекции недостаточной функции мужских половых желез (импотенция, климактерические нарушения), также оказывает влияние на структуру семенника. Введение ряда сочетаний веществ, основным компонентом которых является прогестин, прогестин+андроген, вызывает в семенниках атрофию интерстиция [9]. Врожденные заболевания, такие как варикоцеле, также оказывают негативное влияние на ткань семенника. При морфологическом исследовании яичек при заболевании варикоцеле выявлены дистрофические нарушения в ядерных структурах и цитоплазматическом ретикулуме интерстициальных эндокриноцитов, что ведет к снижению секреции гормона (тестостерона) и свидетельствует об угнетении функции вышеупомянутых клеток. При этом влияние липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий на структурные изменения в интерстициальной ткани семенников практически не изучены.

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования явилось изучение возможных структурных изменений в межканальцевой интерстициальной ткани семенников самцов белых крыс при воздействии бактериального липополисахарида *S. marcescens*.

Материал и методы

Объектом исследования являлись половозрелые самцы беспородных белых крыс. Агентом воздействия - ЛПС *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), производства фирмы «Sigma», США.

В эксперименте было использовано 72 самца 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. Во избежание систематической ошибки группы формировали из крыс одного возраста, в одинаковое время, из одной популяции.

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 (табл. 1).

Таблица 1 – Количественное распределение животных в эксперименте

Сроки после воздействия, сутки	Количество животных в группах	
	Контроль (физ. раствор)	Опыт (ЛПС <i>S. marcescens</i>)
3-и сутки	6	6
10-е сутки	6	6
20-е сутки	6	6
30-е сутки	6	6
40-е сутки	6	6
50-е сутки	6	6
Итого:	36	36

Самцов экспериментальных групп на 3-и, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е и 50-е сутки после воздействия ЛПС *S. marcescens* усыпляли парами эфира с последующей декапитацией. Животных вскрывали и выделяли семенники. Один из семенников фиксировали в жидкости Карнуа. После фиксации взятый материал маркировался и обезжизивался в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, а затем пропитывался в ксилоле, ксилол-парафине, при 56°C – в парафине. Затем образцы заключались в парафин и готовились парафиновые блоки, из которых изготавливались парафиновые срезы толщиной 5 мкм и монтировались на предметные стекла. После чего проводились через батарею депарафинации и окрашивались гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы обезжизивались в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, пропитывались карбол-ксилолом, ксилолом и заключались в полистирол.

На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических препаратах проводили общую оценку состояния межканальцевого

интерстиция семенников экспериментальных животных и морфометрию: определяли диаметр перитубулярных гемакапилляров, подсчитывали количество интерстициальных эндокриноцитов в поле зрения (10 полей зрения, ув. 100) и определяли площадь их ядер.

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% ($p < 0,05$).

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью цифровой фотокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) в комплексе с микроскопом Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Германия) и программы компьютерного анализа изображения ImageWarp (Bit Flow, США).

Результаты и обсуждение

В семенниках опытных животных при однократном внутривентриальном введении

ЛПС *S. marcescens* в дозе 50 мкг/кг массы наблюдается отечность межканальцевой стромы и уменьшение количества интерстициальных клеток по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. Экспериментально установлено, что количество последних в межканальцевой строме семенников крыс опытной группы снижено во все сроки после воздействия липополисахарида по сравнению с контрольными животными. Статистически достоверное снижение их количества регистрируется на 3-и, 30-е, 40-е и 50-е сутки после воздействия на 24,42% ($Z=2,61$, $p=0,00$), на 10,87% ($Z=2,19$, $p=0,02$), на 19,51% ($Z=2,20$, $p=0,02$) и на 4,63% ($Z=1,98$, $p=0,04$), соответственно (табл. 2, рис. 1).

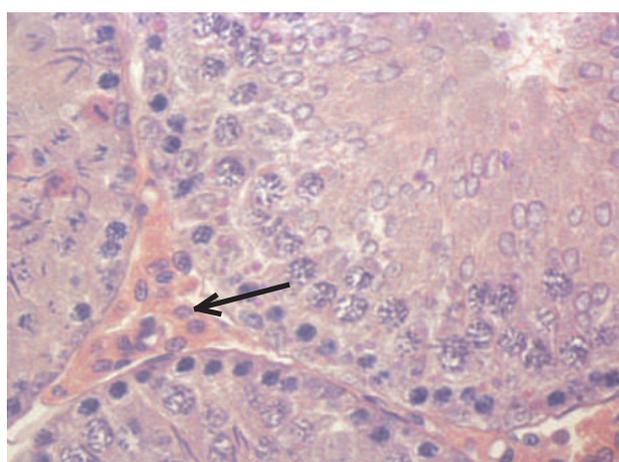
Интерстициальные эндокриноциты опытной группы отличаются полиморфизмом, располагаются преимущественно группами, имеют отростчатую или овальную форму. Цитоплазма клеток зачастую микровакуолизирована с неравномерно распределенной и разной по тинкториальным свойствам зернистостью. Ядра клеток во все исследуемые сроки, как показали данные морфометрии, уменьшены в размере (табл. 3). Статистически достоверное снижение площади ядер регистрируется на 3-и, 40-е и 50-е сутки после воздействия ЛПС *S. marcescens* на 20,70% ($Z=1,96$, $p=0,04$), на 18,39% ($Z=1,96$, $p=0,06$) и на 2,87% ($Z=1,96$, $p=0,04$), соответственно.

В семенниках животных опытной группы

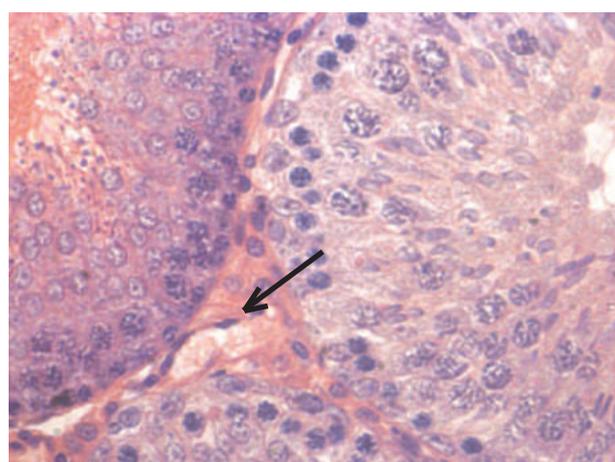
Таблица 2 – Количество интерстициальных клеток в межканальцевой строме семенников у самцов крыс в контрольной группе и после воздействия ЛПС *S. marcescens* на 3-и, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е и 50-е сутки (Me (Q_1 ; Q_2))

Сроки после воздействия	Контроль n=36	Опыт n=36
3-и сутки	8,23 (8,07; 8,38)	7,09*↓ (6,48; 7,20)
10-е сутки	7,30 (6,93; 8,66)	6,54 (6,16; 7,05)
20-е сутки	8,17 (7,34; 8,87)	6,76 (6,51; 7,35)
30-е сутки	7,45 (7,31; 7,59)	5,91*↓ (5,76; 6,87)
40-е сутки	8,20 (7,88; 8,66)	6,01*↓ (5,88; 7,27)
50-е сутки	7,99 (7,81; 8,03)	7,12*↓ (6,98; 7,48)

Примечание: * – $p<0,05$ при сравнении с контролем; ↓ – статистически значимое снижение изучаемого параметра.



А



Б

Рисунок 1 – Интерстициальные клетки в межканальцевой строме семенников у крыс в контрольной группе (А), и у крыс на 3-и сутки после однократного внутрив брюшинного введения ЛПС *S. marcescens* (Б). Уменьшение количества интерстициальных эндокриноцитов в семенниках у крыс в опытной группе. Окраска Г и Э. Цифровая микрофотография. Ув. об. 40.

Таблица 3 – Площадь ядер интерстициальных клеток в межканальцевой строме семенников у самцов крыс в контрольной группе и после воздействия ЛПС *S. marcescens* на 3-и, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е и 50-е сутки (Me (Q₁; Q₂))

Сроки после воздействия	Контроль n=36	Опыт n=36
3-и сутки	23,76 (23,57; 24,65)	18,84*↓ (15,59; 23,45)
10-е сутки	19,51 (18,55; 23,41)	19,89 (18,87; 24,86)
20-е сутки	19,08 (18,97; 21,45)	19,96 (19,69; 25,39)
30-е сутки	20,21 (19,56; 20,32)	18,19(15,84; 21,76)
40-е сутки	23,97 (23,91; 24,17)	19,56*↓ (16,73; 23,43)
50-е сутки	22,97 (22,93; 24,98)	22,31*↓ (19,65; 22,92)

Примечание: * – p<0,05 при сравнении с контролем; ↓ – статистически значимое снижение изучаемого параметра.

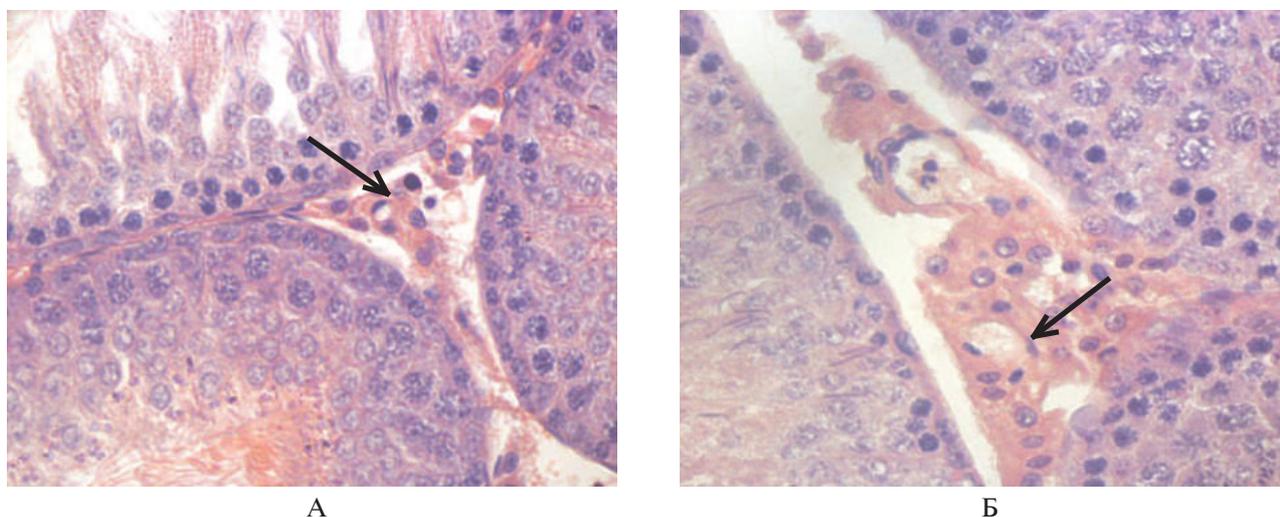


Рисунок 2 – Перитубулярные гемокапилляры в межканальцевой строме семенников у крыс в контрольной группе (А) и у крыс на 3-и сутки после однократного внутрибрюшинного введения ЛПС *S. marcescens* (Б). Увеличение диаметра перитубулярных гемокапилляров в семенниках у крыс в опытной группе. Окраска Г и Э. Цифровая микрофотография. Ув. об. 40.

Таблица 4 – Диаметр перитубулярных гемокапилляров в межканальцевой строме семенников у самцов крыс в контрольной группе и после воздействия ЛПС *S. marcescens* на 3-и, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е и 50-е сутки (Me (Q₁; Q₂))

Сроки после воздействия	Контроль n=36	Опыт n=36
3-и сутки	10,76 (10,14; 11,71)	14,76*↑ (14,51; 15,63)
10-е сутки	11,05 (9,68; 12,03)	12,41 (11,10; 13,48)
20-е сутки	11,30 (11,07; 11,76)	11,89 (11,16; 12,91)
30-е сутки	11,72 (11,44; 11,92)	15,40*↑ (15,00; 15,63)
40-е сутки	12,02 (11,49; 12,07)	15,37*↑ (14,35; 15,87)
50-е сутки	12,05 (11,72; 12,12)	12,31 (11,74; 12,65)

Примечание: * – p<0,05 при сравнении с контролем; ↑ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

при введении бактериального липополисахарида *S. marcescens* перитубулярные гемокапилляры расширены. В некоторых наблюдаются гемостаз и лейкоцитарная инфильтрация. Экспериментально установлено, что их диаметр увеличивается и статистически достоверные различия наблюдаются на 3-и сутки - на 37,17% ($Z=2,12$, $p=0,03$) (рис. 2), 30-е сутки - на 31,39% ($Z=2,12$, $p=0,03$) и 40-е сутки - и на 27,87% ($Z=2,44$, $p=0,01$) после воздействия (табл. 4).

Заключение

Таким образом, в процессе исследования установлено, что введение бактериального липополисахарида *S. marcescens* самцам крыс вызывает развитие разнообразных структурных изменений в интерстициальной ткани семенников опытных животных. Наблюдается отечность межканальцевой стромы семенников и увеличение диаметра перитубулярных гемокапилляров, а также снижается количество интерстициальных эндокриноцитов и уменьшается площадь их ядер. Все вышеуказанные изменения сохраняются на протяжении довольно длительного периода после воздействия бактериального липополисахарида *S. marcescens* (3-и, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е и 50-е сутки) и могут приводить к нарушению сперматогенеза у животных.

References

1. Bykov BL. Spermatogenez u muzhchin v kontse XX veka (obzor literatury) [Spermatogenesis at men at the end of the 20th century (the review of literature)]. Problemy Reproduktsii. 2000;(1):6-13.
2. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008 Apr;109(3-5):323-30.
3. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. Hum Reprod. 1998 Apr;13 Suppl 1:1-8.
4. Bergh A. Paracrine regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules. Int J Androl. 1983 Feb;6(1):57-65.
5. Dudenkova NA, Shubina OS. Izmeneniia morfofunktsional'nogo sostoiianiia i produktivnosti semennykh zhelez belykh kryis pri vozdeistvii atsetata svintsia [Changes of a morfofunktsionalny state and efficiency of seed glands of white rats at lead acetate

Литература

1. Быков, В. Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы) / В. Л. Быков // Проблемы репродукции. – 2000. – № 1. – С. 6–13.
2. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis / N. Sofikitis [et al.] // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2008 Apr. – Vol. 109, N 3/5. – P. 323–330.
3. Spermatogenesis / D. M. de Kretser [et al.] // Hum. Reprod. – 1998 Apr. – Vol. 13, suppl. 1. – P. 1–8.
4. Bergh, A. Paracrine regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules / A. Bergh // Int. J. Androl. – 1983 Feb. – Vol. 6, N 1. – P. 57–65.
5. Дуденкова, Н. А. Изменения морфофункционального состояния и продуктивности семенных желез белых крыс при воздействии ацетата свинца / Н. А. Дуденкова, О. С. Шубина // Фундам. исслед. – 2013. – №10, ч. 6. – С. 1253–1259.
6. Стресс-индуцированные изменения антиоксидантного статуса сперматозоидов и морфологии семенников крыс / К. А. Кидун [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – № 2. – С. 125–129.
7. Общая токсикология / под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова. – Москва : Медицина, 2002. – 608 с.
8. Аль Меселмани, М. А. Влияние гамма-излучения на митохондриальное окисление в семенниках крыс / М. А. Аль Меселмани // Мед. журн. – 2010. – № 4. – С. 17–20.
9. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice / P. J. O'Shaughnessy [et al.] // Mol. Cell Endocrinol. – 2009 Jul. – Vol. 306, N 1/2. – P. 2–8.

Поступила 15.06.2016 г.

Принята в печать 05.08.2016 г.

influence]. Fundam Issled. 2013;10 ch 6;1253-9.

6. Kidun KA, E. K. Solodova, Ugolnik TS, Doroshenko RV. Stress-indutsirovannye izmeneniia antioksidantnogo statusa spermatozoidov i morfologii semennikov kryis [The stress-induced changes of the antioxidative status of spermatozoons and morphology of spermaries of rats]. Problemy Zdorov'ia i Ekologii. 2014;(2):125-9.
7. Kurlyandskiy BA, Filov VA, red. Obshchaia toksikologiya [General toxicology]. Moscow, RF: Meditsina; 2002. 608 p.
8. Al Meselmani MA. Vliianie gamma-izlucheniia na mitokhondrial'noe okislenie v semennikakh kryis [Influence of a gamma radiation on mitochondrial oxidation in spermaries of rats]. Med Zhurn. 2010;(4):17-20.
9. O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Huhtaniemi I, Baker PJ, Abel MH. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. Mol Cell Endocrinol. 2009 Jul;306(1-2):2-8.

Submitted 15.06.2016

Accepted 05.08.2016

Сведения об авторах:

Поплавская Е.А. – к.б.н., ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Information about authors:

Paplauskaya Elena A. – Candidate of Biological Sciences, teacher of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Educational Establishment «Grodno State Medical University».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230021 г. Гродно, ул. Белые Росы, 71А-42.
E-mail: Len.poplavska@mail.ru – Поплавская Елена Александровна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 230021, Grodno, 71A Belyje Rosy str., 42. E-mail: len.poplavska@mail.ru – Paplauskaya Elena A.