

УДК 611.6 + 59.084:615.37

С.А. Кащенко

д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГУ ЛНР Луганский государственный медицинский университет им. Святого Луки

А.А. Захаров

канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГУ ЛНР Луганский государственный медицинский университет им. Святого Луки

S.A. Kashchenko

MD, PhD, DSci, Full Prof., Chair of Histology, Cytology and Embryology, St. Luke Luhansk State Medical University

A.A. Zakharov

MD, PhD, Associate Prof., Histology, Cytology and Embryology, St. Luke Luhansk State Medical University

Влияние иммуносупрессии на морфоструктуру придатка семенника экспериментальных животных периода выраженных старческих изменений

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Захаров Алексей Александрович, канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГУ ЛНР Луганский государственный медицинский университет им. Святого Луки

Адрес: 91045, г. Луганск, кв. 50-летия Оборона Луганска, д. 1г

Тел.: +10 (380-509) 67-87-05

E-mail: masterhist@mail.ru

Статья поступила в редакцию: 11.04.2018

Статья принята к печати: 04.06.2018

Аннотация

Вопросы бесплодия, рассматриваемые как важная составляющая часть современной медицины, являющиеся в то же время существенной общественной проблемой, становятся актуальными для людей пожилого возраста в связи с увеличением средней продолжительности жизни. Наряду с этим в последние годы усиливается негативное влияние комплекса антропогенных и экологических факторов на состояние здоровья человека, что особенно актуально для промышленно-развитых регионов, в том числе и для Донбасса. Доказано, что внешние влияния, включая применение комплекса разнообразных медикаментозных агентов, вызывают типичную ответную реакцию организма, проявляющуюся системной иммуносупрессией. Состояние данного вопроса регламентирует цель исследования: установление в эксперименте особенностей строения придатка семенника животных периода выраженных старческих изменений в условиях длительной системной иммуносупрессии. Исследование выполнено на 60 белых крысах периода

Influence of immunosuppression on morphostructure of the epididymis in experimental animals in the period of pronounced senile changes

CONTACT INFORMATION

Alexey A. Zakharov, MD, PhD, Associate Prof., Histology, Cytology and Embryology, St. Luke Luhansk State Medical University

Address: 1g, 50th anniversary of the Defense of Luhansk bl., Luhansk, 91045, Luhansk People's Republic

Tel.: +10 (380-509) 67-87-05

E-mail: masterhist@mail.ru

Article received on: April 11, 2018

Article approved on: June 4, 2018

Abstract

Infertility issues, regarded as an important component of modern medicine, which are, at the same time, a significant public problem, are becoming relevant for the elderly due to the increase in the average life expectancy. Alongside with that, in recent years, the negative impact of a complex of anthropogenic and environmental factors on the state of human health has been intensifying, which is especially important for the industrialized regions, including the Donbass. It has been proved that external influences, including the use of a complex of various medications, cause a typical response of the body, manifesting as systemic immunosuppression. The state of this issue prescribes the purpose of the study: the establishment in the experiment of morphogenesis of specific features of the epididymis in animals' testes in the period of pronounced senile changes under conditions of prolonged systemic immunosuppression. The study was carried out on 60 white rats in the period of pronounced senile changes. The state of immunosuppression was modeled by the use of an alkylating cytostatic cyclophosphamide

выраженных старческих изменений. Состояние иммуносупрессии моделировали путем применения алкилирующего цитостатика циклофосфида в дозировке 1,5 мг/кг массы тела внутримышечно в течение 10 дней. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после прекращения введения иммуносупрессора. Со стороны придатков семенников животных периода выраженных старческих изменений отмечается выраженная реакция в ответ на длительную системную иммуносупрессию. Макроморфометрические параметры органа претерпевают статистически значимые изменения как на ранних, так и на поздних сроках наблюдения (7, 15 и 30-е сут), что свидетельствует о кумулятивном токсическом и иммуносупрессивном действии циклофосфида на структуру придатков гонад. Изменения показателей на микроскопическом уровне в аналогичные сроки подтверждают сдвиги органомерических показателей органа, свидетельствующие о нарушении его гомеостаза, вызванного дисфункцией регуляторных процессов. Полученные результаты вызывают интерес к изучению особенностей строения придатков семенника в условиях острой иммуносупрессии в возрастном аспекте.

Ключевые слова: придаток семенника, иммуносупрессия, крыса, циклофосфамид.

at a dosage of 1.5 mg/kg body weight intramuscularly for 10 days. The rats were taken out of the experiment by decapitation under ether anesthesia at 1, 7, 15, 30 and 60 days after the immunosuppressant was discontinued. In the epididymis of animals in the period of pronounced senile changes, a strong reaction is observed in response to prolonged systemic immunosuppression. Macromorphometric parameters of the organ undergo statistically significant changes in both early and late observation periods (7, 15 and 30 days), which indicates cumulative toxic and immunosuppressive effects of cyclophosphamide on the morphogenesis of epididymis. Changes in indicators at a microscopic level in the same period confirm the shifts in the organ's body indicators, which confirms a disruption to its homeostasis caused by dysfunction of regulatory processes. The obtained results arouse interest in the study of the morphogenesis of the epididymis in conditions of acute immunosuppression in relation to age.

Keywords: epididymis, immunosuppression, rat, cyclophosphamide.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в последние десятилетия отмечается увеличение средней продолжительности жизни в большинстве стран мира, что предполагает усиление социально-экономического акцента на улучшение качества жизни. В связи с этим вопросы бесплодия, рассматриваемые как важная составляющая часть современной медицины, являющиеся в то же время еще и существенной общественной проблемой, становятся актуальными для людей пожилого возраста. Наряду с этим в последние годы усиливается негативное влияние комплекса антропогенных и экологических факторов на состояние здоровья человека [1], что особенно актуально для промышленно-развитых регионов, в том числе и для Донбасса [2]. Известно, что активная реакция в ответ на экзогенные воздействия в первую очередь проявляется со стороны регуляторных систем организма — иммунной, эндокринной и нервной — что не может не отражаться на морфофункциональных особенностях других органов. Доказано, что внешние влияния, включая применение комплекса разнообразных медикаментозных агентов, вызывают

типичную ответную реакцию организма, проявляющуюся системной иммуносупрессией [3]. Однако морфометрические изменения строения органов репродуктивной системы, в частности придатков семенников, в условиях длительного угнетения иммунной системы до сих пор не являлось предметом пристального внимания специалистов. Практически не изучено состояние органа при его выраженных старческих изменениях в условиях иммуносупрессии.

Состояние данного вопроса регламентирует **цель исследования:** установление в эксперименте особенностей морфоструктуры придатка семенника животных периода выраженных старческих изменений в условиях длительной системной иммуносупрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 60 белых крысах периода выраженных старческих изменений, полученных из вивария лабораторных животных ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет

им. Святителя Луки». Грызуны получали полноценный рацион и содержались в стандартных условиях. Состояние иммуносупрессии моделировали путем применения алкилирующего цитостатика циклофосфида в дозировке 1,5 мг/кг массы тела внутримышечно в течение 10 дней. Животные, получавшие эквивалентные объемы 0,9 % раствора NaCl по той же схеме, формировали контрольную группу. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после прекращения введения иммуносупрессора. При работе с животными руководствовались Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [4]. Придатки семенников взвешивали на торсионных весах, рассчитывали относительную массу, определяли линейные размеры с помощью штангенциркуля: длину, ширину и толщину. Объем органа устанавливали методом вытеснения воды [5].

Придатки семенника подвергались стандартной гистологической проводке, полученные срезы толщиной 4–6 мкм окрашивались гематоксилин-эозином и фотографировались с помощью автоматизированного морфометрического комплекса Olympus CX-41. Морфометрические измерения объектов проводили путем загрузки полученных цифровых изображений в компьютерную программу АСКОН «Компас-3D 17.0» с калибровкой с помощью фотографий объект-микрометра в аналогичных режимах съемки. На микроскопическом уровне в придатках семенников исследовали высоту и ширину эпителиоцитов, их объем, а также больший и меньший диаметры и объем ядер клеток. Объемные показатели рассчитывали по формуле вытянутого эллипсоида вращения:

$$V = \frac{\pi AB^2}{6},$$

где V — объем ядра; A — больший диаметр; B — меньший диаметр [6].

Полученные данные обрабатывали с использованием лицензионной программы StatSoft Statistica v. 6.0. Применялись методы параметрической статистики, так как использование критерия Шапиро—Уилка позволило установить нормальное распределение показателей в выборке. Достоверность различий между показателями экспериментальных и контрольных групп определяли с помощью критерия Стьюдента—Фишера с вероятностью ошибки $p < 0,05$, допустимой для медико-биологических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Придаток семенника животных периода выраженных старческих изменений находится на дор-

сальном крае гонады, разделяется на головку, тело и хвост. Головка сформирована канальцами, тело и хвост представлены многочисленными извитостями протока придатка семенника, в просвете которого находится умеренное количество сформированных сперматозоидов (рис. 1).

Проток выстлан двурядным эпителием, содержащим призматические реснитчатые эпителиоциты и вставочные клетки. Динамика макроморфометрических параметров органов животных контрольных групп представлена в табл. 1.

После применения препарата принцип строения органа не изменился, однако была установлена динамика органомерических параметров. Так, достоверное отличие показателя было определено на 7, 15 и 30-е сутки после окончания введения циклофосфида: абсолютная масса уменьшалась на 8,87, 5,77 и 7,01 % соответственно. Значения относительной массы изменялись однонаправленно и синхронно: уменьшение показателей составило 7,97, 5,21 и 15,07 % соответственно срокам наблюдения. Линейные и объемные параметры органов после применения иммуносупрессора претерпевали сходные изменения. Так, достоверные отклонения были установлены на 7, 15 и 30-е сутки (рис. 2).

Морфометрические параметры клеток эпителия придатка крыс контрольных групп претерпевали закономерную динамику по мере увеличения срока наблюдения (табл. 2).

После применения иммуносупрессора макроморфометрические показатели эпителиоцитов статистически значимо отличались от значений контрольных данных. Так, высота и ширина клеток уменьшалась на 10,18, 11,49, 4,98 и 6,95 %, 4,47 и 4,02 % соответственно 7, 15 и 30-м суткам наблюдения (рис. 3).

Объем эпителиоцитов статистически значимо снижался в те же сроки относительно контрольных данных на 22,18, 19,17 и 12,48 % соответственно.

Размеры ядер эпителиоцитов также претерпевали достоверные изменения по сравнению с данными контрольной группы животных. Так, больший диаметр ядра после применения иммуносупрессора значимо уменьшался на 6,10, 4,30 и 8,16 %, меньший диаметр — на 1,91, 4,13 и 2,62 % на 7, 15 и 30-е сутки наблюдения соответственно.

Величина объема ядер эпителиальных клеток, опосредованно отражающая их функциональное состояние, также достоверно изменялась под действием иммуносупрессора. Снижение показателей отмечалось на ранних и отдаленных сроках наблюдения на 22,18, 19,17 и 12,48 % (7, 15 и 30-е сутки). Через 60 дней после завершения введения препарата статистически значимых отличий между данными экспериментальной и контрольной групп по всем морфометрическим показателям ядер установлено не было, что может свидетельствовать о реадaptации

морфоструктуры органа на поздних сроках эксперимента.

Отличия исследуемых параметров на 7, 15 и 30-е сутки после окончания применения иммуносупрессора от контрольных данных может быть вызвано значительной кумуляцией его цитотоксического действия в результате пролонгированного

применения, что в то же время объясняет отсутствие достоверных изменений на ранних сроках наблюдения. Также одним из фармакодинамических эффектов препарата в используемой дозировке является дисфункция биосинтетического и энергетического аппаратов клетки, что приводит к нарушениям ее гомеостаза и выполняемых

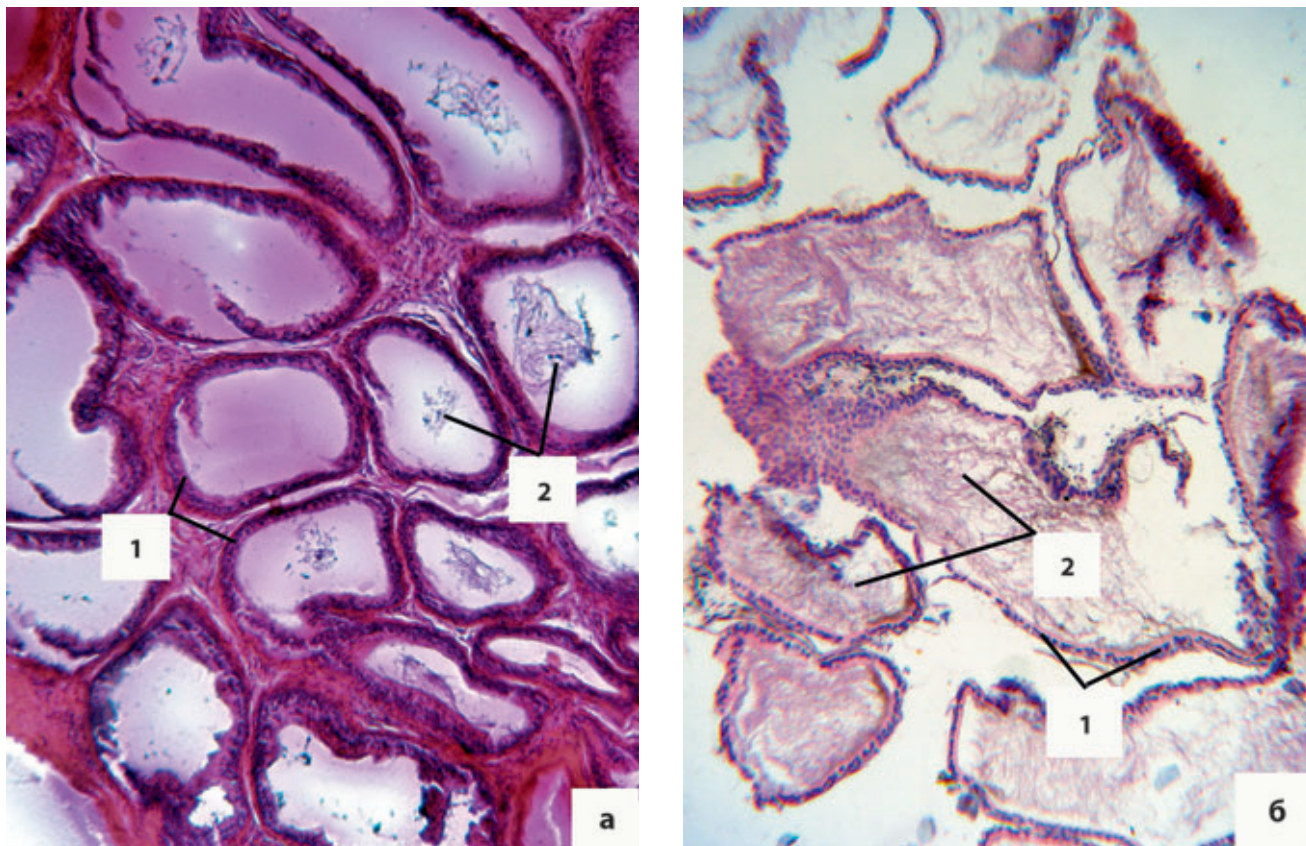


РИС. 1. Участок придатка семенника животных периода выраженных старческих изменений на 15-е сутки наблюдения: *a* — после применения циклофосфида; *б* — в группе контроля;

1 — эпителий канальцев придатка; 2 — сперматозоиды в просвете канальцев.

Окраска гематоксилин-эозином. Ув.: приближение Zoom 18,5; объектив PlanCN 10×/0.25 ∞/-/FN22

Таблица 1

Макроморфометрические параметры придатков семенников крыс периода выраженных старческих изменений в группе контроля (M ± m; n = 30)

Параметры	Сроки наблюдения (сутки)				
	1	7	15	30	60
Абсолютная масса, мг	522,35 ± 8,46	570,81 ± 9,54	591,23 ± 10,58	641,45 ± 5,68	653,21 ± 19,55
Относительная масса, мг/г	1,60 ± 0,12	1,56 ± 0,03	1,70 ± 0,02	1,60 ± 0,03	1,26 ± 0,04
Длина, мм	52,35 ± 1,23	52,38 ± 0,62	51,88 ± 0,30	52,87 ± 0,48	56,90 ± 2,00
Ширина, мм	15,82 ± 0,22	15,96 ± 0,11	16,16 ± 0,09	16,13 ± 0,14	16,40 ± 0,18
Толщина, мм	9,59 ± 0,13	9,87 ± 0,08	10,22 ± 0,10	10,86 ± 0,15	11,17 ± 0,23
Объем, мм ³	4158,41 ±59,68	4320,18 ±36,47	4486,19 ±69,22	4849,08 ±58,32	5457,52 ±64,21

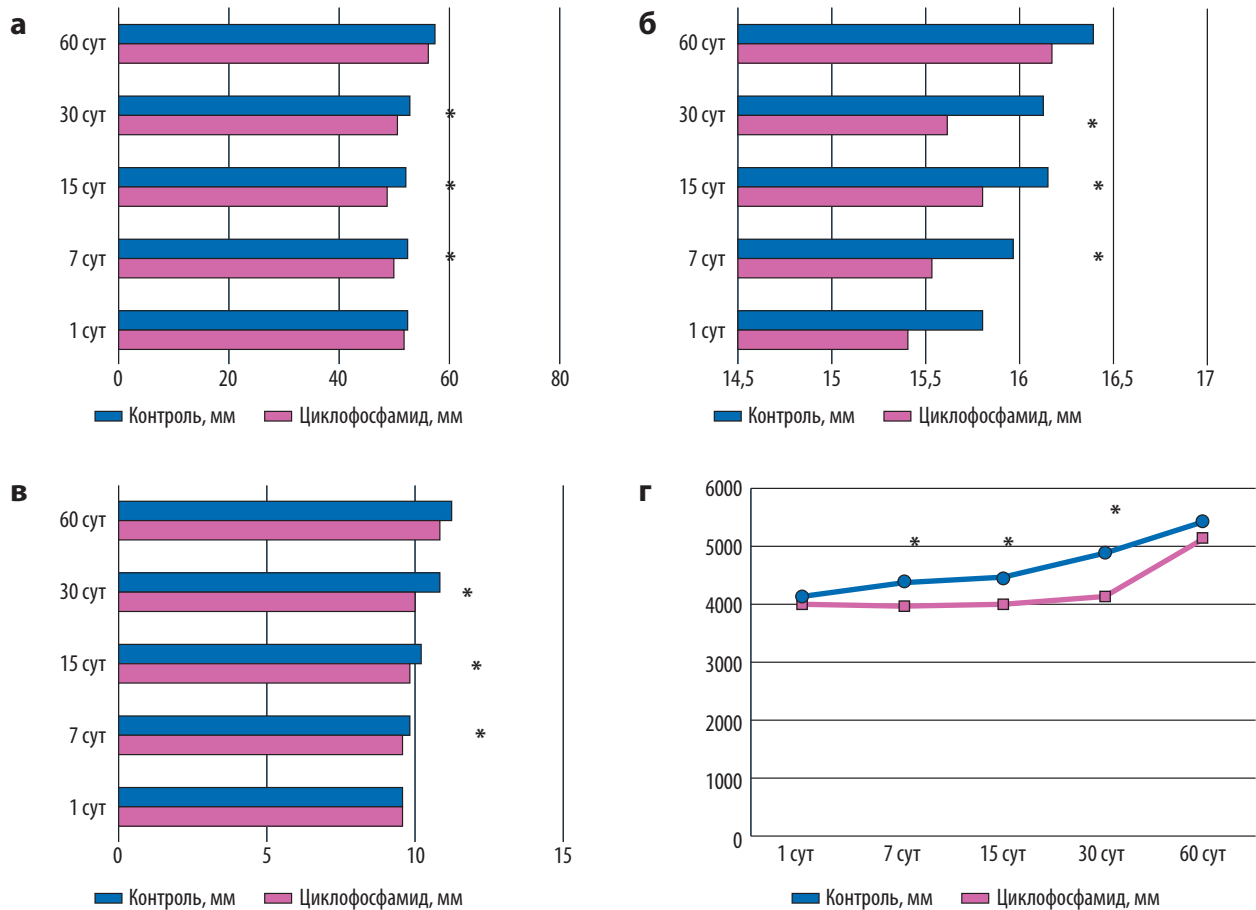


РИС. 2. Изменения длины (а), ширины (б), толщины (в) и объема (г) придатков семенников после применения циклофосфамида и в группе контроля

* Достоверное отличие от контрольных данных ($p < 0,05$).

Таблица 2

Микроморфометрические параметры эпителиоцитов придатков семенников крыс периода выраженных старческих изменений в группе контроля ($M \pm m$; $n = 30$)

Параметры	Сроки наблюдения (сутки)				
	1	7	15	30	60
Высота эпителиоцита, мкм	17,65 ± 0,39	17,55 ± 0,55	17,87 ± 0,17	17,21 ± 0,28	17,14 ± 1,12
Ширина эпителиоцита, мкм	11,56 ± 0,38	11,97 ± 0,18	11,68 ± 0,19	11,32 ± 0,09	11,16 ± 0,97
Объем эпителиоцита, мкм ³	993,46 ± 40,96	1024,59 ± 28,93	1031,74 ± 26,12	1010,54 ± 8,54	1033,30 ± 16,55
Большой диаметр ядра, мкм	6,81 ± 0,28	6,15 ± 0,09	6,04 ± 0,07	6,11 ± 0,04	6,00 ± 0,12
Меньший диаметр ядра, мкм	5,17 ± 0,06	5,16 ± 0,03	5,12 ± 0,03	5,03 ± 0,04	4,97 ± 0,09
Объем ядра, мкм ³	95,31 ± 7,69	85,74 ± 2,32	82,90 ± 2,98	80,94 ± 3,42	77,60 ± 5,63

функций. Подобные результаты были получены Звягиной В.И. и соавт. (2015) при изучении структурно-функциональных изменений митохондриального ферментного комплекса в условиях угнетения его активности в клетках придатка семен-

ника [7]. Кроме прямого влияния циклофосфамида на структуру изучаемого органа возможно и опосредованное — путем нарушения гормональной регуляции кооперации структурных компонентов придатка. Так, угнетающее влияние применения

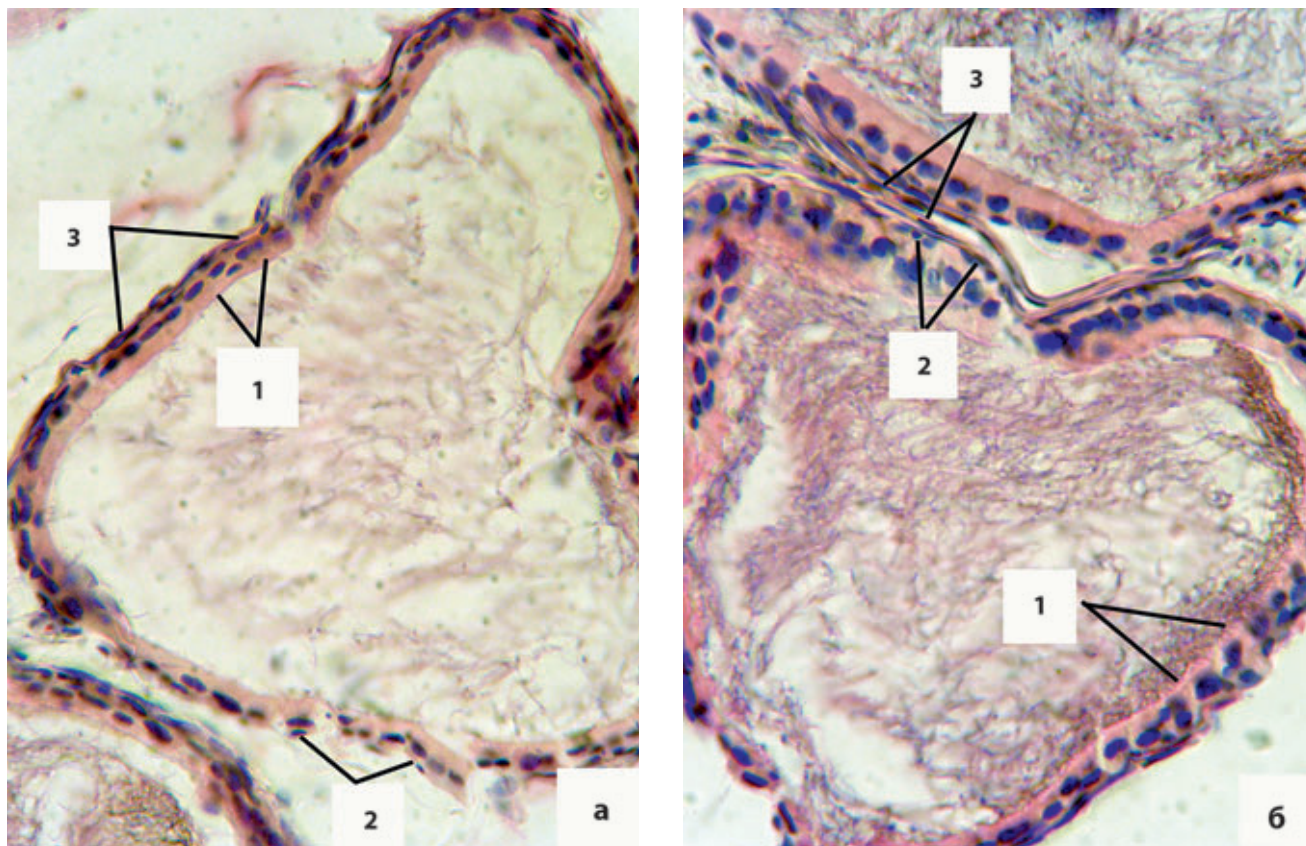


РИС. 3. Участок придатка семенника животных периода выраженных старческих изменений через 30 суток: *а* — после применения циклофосфамида; *б* — после применения 0,9 % раствора NaCl; 1 — реснитчатые клетки; 2 — вставочные клетки; 3 — стенка протока. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.: приближение Zoom 18,5; объектив PlanCN 40×/0.65 ∞/0.17/FN22

токсичной дозы циклофосфамида на андроген-рецепторный аппарат sustentоцитов и glanduloцитов семенников крыс репродуктивного периода доказано Лапиным К.Н. и соавт. (2017) [8]. В то же время проведенное исследование свидетельствует о том, что степень реактивности придатка животных периода выраженных старческих изменений снижена относительно изменений морфоструктуры органа у половозрелых животных, что может быть объяснено закономерным возрастным угасанием активности синтетических процессов и регенераторных способностей придатков гонад [9].

ВЫВОДЫ

1. Со стороны придатков семенников животных периода выраженных старческих изменений отмечается выраженная реакция в ответ на длительную системную иммуносупрессию.
2. Макроморфометрические параметры органа претерпевают статистически значимые изменения как на ранних, так и на поздних сроках

наблюдения (7, 15 и 30-е сутки), что свидетельствует о кумулятивном токсическом и иммуносупрессивном действии циклофосфамида на структуру придатков гонад.

3. Изменения показателей на микроскопическом уровне в аналогичные сроки подтверждают сдвиги органометрических показателей органа, свидетельствующие о нарушении его гомеостаза, вызванного дисфункцией регуляторных процессов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Галимова Э.Ф., Ахмадуллина Г.Х., Мочалов К.С., Булыгин К.В., Травников О.Ю., Галимов Ш.Н. Влияние органических загрязнителей на репродуктивное здоровье. Медицина труда и промышленная экология. 2018; 4: 51–54.
[Galimova E.F., Ahmadullina G.H., Mochalov K.S., Bulygin K.V., Travnikov O.Yu., Galimov Sh.N. Influence of pollutants on reproductive health. Meditsina truda i promyshlennaiia ekologiya. 2018; 4: 51–54 (in Russian).]

2. Брюхин Г.В., Ласьков Д.С., Сизоненко М.Л. Влияние иммобилизационного стресса на двигательную активность сперматозоидов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени. Пробл. репрод. 2013; 1: 17–20.
[Brjukhin G.V., Las'kov D.S., Sizonenko M.L. Influence of immobilization stress on the motor activity of spermatozoa in the offspring of female rats with experimental liver damage. Reproductive problems. 2013; 1: 17–20 (in Russian).]
3. Кащенко С.А., Ерохина В.В. Ультрамикроскопические изменения паращитовидных желез крыс после коррекции циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии иммунофаном. Український морфологічний альманах. 2014; 1: 61–64.
[Kashchenko S.A., Erokhina V.V. Ultramicroscopic changes in parathyroid glands of rats after correction of cyclophosphamide-induced immunosuppression with immunophane. Ukrainian morphological almanac. 2014; 1: 61–64 (in Russian).]
4. Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях от 2010 г. № 2010/63/EU. Санкт-Петербург: НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными», 2012.
[Directive of the European Parliament and the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes as of 2010 No. 2010/63/ EU. St. Petersburg: NP "Association of experts in working with laboratory animals"; 2012 (in Russian).]
5. Erfani Majd N., Bahrami M., Morovati H., Najafzadehvarzi H. The protective effect of aloe vera on histological and histometrical structure of diabetic rat testis. Scientific-Research Iranian veterinary journal. 2013; 9(239): 78–87.
6. Бессалова Е.Ю. Биометрические показатели семенников крыс при парентеральном введении спинномозговой жидкости. Вісник проблем біології та медицини. 2011; 4(90): 195–197.
[Bessalova E.Ju. Biometric parameters of testis of rats with parenteral administration of cerebrospinal fluid. Bulletin of Biology and Medicine. 2011; 4(90): 195–197 (in Russian).]
7. Звягина В.И., Бельских Э.С., Медведев Д.Э. Изучение функционального состояния митохондрий придатка яичка крыс в условиях изменения синтеза оксида азота (II). Казанский медицинский журнал. 2015; 96(5): 814–818.
[Zvjagina V.I., Bel'skih E.S., Medvedev D.E. The study of the functional state of the mitochondria of the epididymis of the testicles in rats under conditions of a change in the synthesis of nitric oxide (II). Kazan Medical Journal. 2015; 96(5): 814–818 (in Russian).]
8. Лапин К.Н., Захарова Н.М. Влияние циклофосфамида на половые клетки крыс. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пушино: Fix-Print, 2017: 773–776.
[Lapin K.N., Zakharova N.M. Effect of cyclophosphamide on germ cells of rats. Pushchino: Fix-Print, 2017: 773–776 (in Russian).]
9. Захаров А.А. Изменения органомерических параметров придатков семенников экспериментальных животных после применения циклофосфамида. Якутский медицинский журнал. 2016; 4: 23–24.
[Zakharov A.A. Changes in the organometric parameters of the epididymis of experimental animals after the administration of cyclophosphamide. Yakut. Medical Journal. 2016; 4: 23–24 (in Russian).]