

ГІСТОЛОГІЧНА БУДОВА ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ САМЦІВ ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ ЕПІХЛОРГІДРИНУ

Державний заклад «Луганський державний медичний університет»

(м. Луганськ)

Представлена робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень ДЗ «Луганський державний медичний університет» та є частиною наукової теми кафедри анатомії людини «Морфогенез органів ендокринної, імунної та кісткової систем під хронічним впливом летучих компонентів епоксидних смол», № державної реєстрації 0109U004615.

Вступ. Останніми роками увага дослідників все більше приділяється проблемам, що пов'язані з морфологією органів репродуктивної системи, як в нормі, так і за умов впливу різних факторів в експерименті, адже статеві системи є чутливою до будь-яких змін у навколишньому середовищі. Контакт людини з хімічними сполуками також спостерігається у побуті при використанні деяких споживчих товарів, при знаходженні у нових помешканнях (щойно після ремонту), де накопичуються леткі компоненти будівельних матеріалів [2].

Одним з таких забруднювачів повітря є епіхлоргідрин (ЕХГ). Він використовується для виробництва синтетичного гліцерину, лакофарбових покриттів, клеїв, епоксидних смол, що, в свою чергу, застосовуються в народному господарстві, в авто- та суднобудуванні, нафтовій промисловості [1], використовується для одержання ливарних та просочувальних компаундів, в гумотехнічній та інших галузях промисловості [8].

Мета дослідження. Враховуючи незначну кількість робіт, що присвячені вивченню впливу епіхлоргідрину на морфогенез внутрішніх органів репродуктивної системи тварин (сім'яники, над'яєчка, сім'яиносна протока, передміхурова залоза, сім'яні пухирці), метою презентованого дослідження стало вивчення гістологічної будови зазначених органів статевозрілих щурів у віддалені терміни після інгаляційного впливу епіхлоргідрину.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальне дослідження виконано на 60 білих щурах-самцях, які були введені в експеримент у віці 12 тижнів та початкова маса яких становила 130-150 г. Тварини були отримані з віварію ДЗ «ЛугДМУ». Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних етичних принципів у сфері біоетики, що викладені у положенні «Общих этических принципов экспериментов на животных», затверджених І Національним конгресом з біоетики

[5], у «Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», що була ратифікована у 1985 році у Страсбурзі [9], згідно стандарту ідентичному міжнародному документу OECD Test № 421 «Reproduction / Developmental Toxicity Screening Test» (ОЕСР Тест № 421 «Скринінгове дослідження репродуктивної/ембріональної токсичності») [3] та вимогам Міжнародного комітету з лабораторних тварин, Міжнародної федерації з захисту тварин та вітчизняними інструктивними документами [7], відповідно до рекомендацій «Про правові, законодавчі та етичні норми і вимоги при виконанні наукових морфологічних досліджень» [4].

Щури були розділені на контрольну та експериментальну серії (серія І). Контрольну серію (К) склали інтактні щури. Серія І була представлена щурами, які зазнавали інгаляційного впливу епіхлоргідрину концентрації 10 мг/м³ протягом 60 днів, 5 днів на тиждень, 5 годин на добу. Епіхлоргідрин – вироблено на Merck-Schuchardt (Schuchardt, 8011, Hohenbrunn bei München, Deutschland). Art. 803296. WGK-3. VbFA II. Spezifikation 0279189. R: 45-10-E23/24/25-34-43. S: 53-9-44. Такі умови створювалися за допомогою спеціальної установки, яка складається з затравочної камери та камери, у якій створювалася та підтримувалася необхідна концентрація діючої речовини; датчика епіхлоргідрину та допоміжного оснащення. Кожна серія тварин була розділена на п'ять груп (по 6 щурів в кожній) у відповідності з терміном виведення тварин з експерименту на 1, 7, 15, 30 та 60 доби після припинення впливу ЕХГ.

Після закінчення досліду тварин зважували на лабораторних вагах та виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом, дотримуючись «Методичних рекомендацій з виведення лабораторних тварин з експерименту». Органи вилучали єдиним комплексом з навколишньою жировою тканиною і ретельно препарували та зважували на аналітичних вагах ВЛА-200 з точністю до 1 мг.

Фіксацію органів проводили у 10% розчині нейтрального формаліну з подальшим промиванням проточною водою та зневоднюванням у батареї спиртів зростаючої концентрації по загально-прийнятій методиці. Матеріал заливали в парафінові блоки. На санному мікроскопі отримували зрізи,

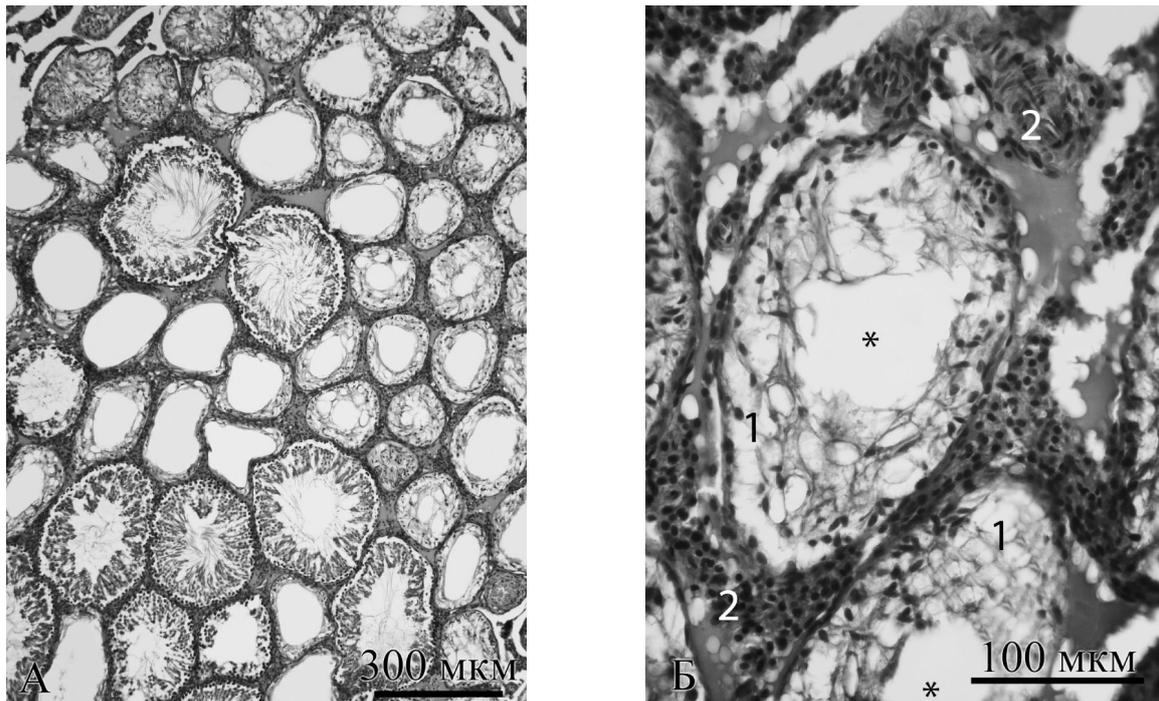


Рис. 1. (А) Яєчко статевозрілого щура І експериментальної серії. (Б) Клітини сперматогенного епітелію. 1 – дезорганізація епітелію; 2 – скупчення клітин в інтерстиції, набряк, відсутність клітин Лейдіга; * – спустошені каналці. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х150.

товщиною 4-5 мкм. Фарбування здійснювали гематоксилін-еозином.

Деталі гістологічної будови зрізів внутрішніх органів статеві системи щурів вивчали за допомогою мікроскопа Olympus BX-41 з використанням об'єктивів Plan 4x ∞/-, Plan 10x x/0. 25, Plan 40x x/0. 65 ∞/0. 17. Морфометричне дослідження об'єктів проводили на комп'ютерному комплексі. Для отримання параметрів об'єктів, що вивчались цифрові зображення завантажували в програму «Master of Morphology, 2008» [6].

Гістоморфометричний аналіз яєчок був проведений на тонких зрізах сім'яників, забарвлених гематоксилін-еозином з використанням програми для аналізу графічних зображень «Olympus». Аналіз полягав у визначенні діаметру звивистих сім'яних каналців, висоти епітелію каналця, індексу сперматогенезу, визначенні відносної кількості ендокриноцитів та розміру їх ядер. Для дослідження над'яєчок використовувались поперечні зрізи голівки, забарвлені гематоксилін-еозином. Вивчалися діаметр просвіту придатка та висота епітелію придатка. Гістоморфометричне дослідження передміхурової залози полягало у визначенні діаметру ядер клітин залозистого епітелію передміхурової залози. Дослідження сім'яних пухирців проводили по поперечних зрізах забарвлених гематоксилін-еозином. Вивчали висоту епітелію сім'яних пухирців. Внутрішню структуру сім'яиносної протоки вивчали на поперечних зрізах з середньої частини органу, що були забарвлені гематоксилін-еозином. Оцінювали такі параметри як максимальний діаметр просвіту протоки та висоту епітелію.

За допомогою статистичних методів дослідження з використанням програми «Basic Statistic. 6. 0» визначали середню, середнє квадратичне відхилення варіант в кожній групі, критерій Ст'юдента (t). Достовірною вважали статистичну похибку менше за 5% ($p < 0,05$). Критичним вважали t-критерій Ст'юдента – 2,23.

Результати досліджень та їх обговорення.

Серед клітин сперматогенного шару щурів контрольної серії спостерігаються клітини на різних етапах сперматогенезу, починаючи від сперматогоній до сперматозоїдів, що вільно розташовуються в просвіті звивистих сім'яних каналців. Переважну частину клітин складають сперматоцити II порядку та сперматиди. Клітини розташовуються широким, безперервним шаром. До базальної мембрани каналців щільно прилягають клітини Сертолі. Тришарову будову має стінка звивистих каналців. Вона складається з базальної мембрани, шару м'яких клітин та фіброзної оболонки. Звивисті сім'яні каналці оточені густою сіткою дрібних капілярів, які збираються в більш крупні судини гемомікроциркуляторного русла (артеріоли, вени). Навколо судин, в інтерстиції, розташовані багатокутної форми клітини Лейдіга. При дослідженні сім'яників тварин I-ЕХГ серії були визначені наступні зміни: велика кількість каналців спустошені, в деяких з них процес сперматогенезу зупиняється на рівні утворення сперматид, просвіти цих каналців, звісно, без вмісту сперматозоїдів, добре виражений набряк інтерстицію (рис. 1).

Діаметр цих сім'яних каналців значно зменшується. Так, на першу добу після припинення дії ЕХГ

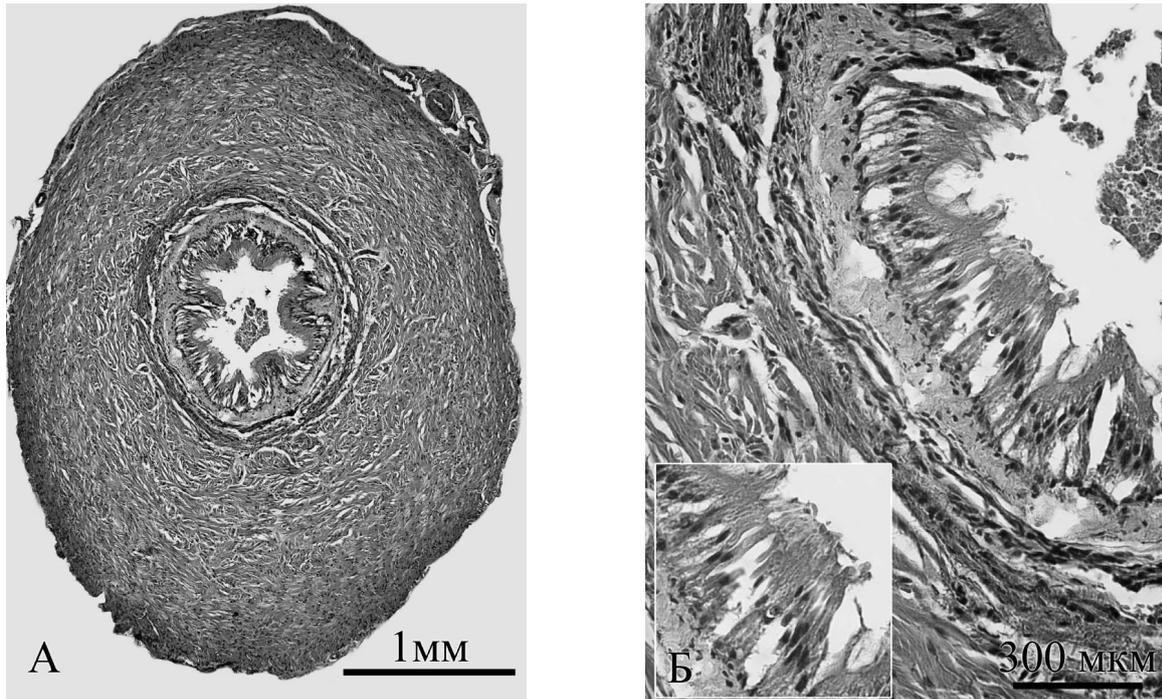


Рис. 2. (А) Сім'явинсна протока статевозрілого щура І експериментальної серії. (Б) Просвіт сім'явинсної протоки із фрагментом епітелію. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х300.

у щурів 1 групи діаметр каналців становив 214,12 мкм, що на 19,3% нижче за показники контрольної групи ($p=0,007$). Наразі зменшується і товщина епітелію каналців. Так, наприклад, у тварин 2 групи І серії вона дорівнювала 135,14 мкм, в порівнянні з даними контролю це нижче на 25,39% ($p=0,004$). Що стосується клітин Лейдїга, то їх відносна кількість, а також діаметр ядер теж значно відрізнялись від показників контрольної серії. Відносна кількість клітин Лейдїга у тварин 1 та 2 груп І серії була меншою відповідно на 23,04% ($p=0,01$) та 22,56% ($p=0,001$), а діаметр ядер цих клітин – на 17,16% ($p=0,001$) та 17,01% ($p=0,003$). Враховуючи кардинальні зміни в сім'яниках щурів І експериментальної серії стає зрозумілим, що і індекс сперматогенезу теж вірогідно відрізняється від контрольних значень. На 7 добу після припинення дії ЕХГ він дорівнював 2,47, що нижче від контролю на 27,78% ($p=0,001$).

Над'яєчко статевозрілих щурів контрольної серії представлено численними інвагінаціями каналців, в просвіті яких розміщується значна кількість сформованих сперматозоїдів. Епітелій псевдобагатощаровий різної висоти, і складається з війчастих епітеліоцитів та низьких клітин з мікроворсинками. Поміж каналців – пухка волокниста сполучна тканина з численними мікросудинами, що обумовлює трофіку органу. Після припинення інгаляційної дії ЕХГ в над'яєчках статевозрілих щурів 1, 2 та 3 груп було відмічено наявність каналців без сперматозоїдів, а також каналців із еозинофільними конгломератами всередині із розширеними просвітами. Звертає на себе увагу набряк інтерстицію та його розшарування, стоншення висоти епітелію. Діаметр просвіту

каналця над'яєчка на 7 та 15 добу після припинення дії ЕХГ дорівнював відповідно 165,15 мкм та 169,65 мкм, що порівняно з контролем вірогідно більше на 24,5 мкм і 23,8 мкм та у відсотках складає 17,42% ($p=0,002$) і 16,32% ($p=0,006$). Як і у каналцях яєчка, так і в каналцях над'яєчка тварин І серії товщина епітелію зменшується. Так, наприклад, через 15 і 30 діб після припинення дії екополютанту вона становила 36,73 мкм та 38,18 мкм, що нижче за контроль на 17,46% ($p=0,001$) і 17,23% ($p=0,003$) відповідно.

На зрізі сім'явинсної протоки щурів контрольної серії спостерігається повздовжня складчастість епітелію. Дистальний сегмент протоки має товсту м'язову стінку, звивисту слизову оболонку і представлений псевдобагатощаровим епітелієм із довгими стереоциліями направленими в просвіт. М'язова оболонка має три шари: внутрішній повздовжній, середній циркулярний і зовнішній повздовжній. Під впливом ЕХГ сім'яна протока щурів експериментальної серії зазнає незначних змін на гістологічному рівні. Так у щурів 1 та 2 груп спостерігається дезінтеграція епітелію, витончення і повне руйнування стереоцилій, масивне злущування клітин у просвіт протоки (**рис. 2**).

Максимальний діаметр просвіту протоки збільшується, а товщина епітелію протоки, навпаки, зменшується. На 7 та 15 доби після припинення інгаляційної дії ЕХГ щури відповідних груп мали наступні розміри просвіту протоки – 292,64 мкм та 277,03 мкм, що більше даних контрольної серії на 14,21% ($p=0,047$) і 13,75% ($p=0,01$). Максимальне відхилення значення товщини епітелію протоки було відмічено у щурів 3 групи, а мінімальне – у

тварин 1 групи. Слід відзначити, що в просвіті протоки спостерігається значна кількість злущених клітин епітелію.

На гістологічних зрізах передміхурової залози щурів контрольної серії всі секреторні відділи заповнені густим секретом, що вказує на високу активність епітелію простати. Епітелій секреторних відділів – кубічний одношаровий і складається з епітеліоцитів, що на апікальній поверхні утворюють численні мікрровирости. Епітелій контактує із базальною мембраною, до якої прилягають пучки гладком'язових волокон. Незначна кількість останніх розміщена в пухкій волокнистій сполучній тканині, що заповнює проміжки між секреторними відділами і є інтерстицієм передміхурової залози, в якому розташовуються судини гемомікроциркуляторного русла. На мікропрепаратах передміхурової залози щурів I експериментальної серії 1, 2 та 3 груп було відмічено значний інтерстиціальний набряк, спустошення секреторних відділів залози, десквамацію залозистого епітелію, скупчення клітин в просвіті відділів, значне зменшення висоти епітелію та вакуолізацію інтерстицію простати. Висота клітин епітелію простати статевозрілих щурів протягом всього періоду експерименту майже не змінюється. Але суттєво змінюється висота епітелію передміхурової залози. Середній показник у щурів контрольної серії становить $22,02 \text{ мкм} \pm 2,07$, а тварин, що зазнавали інгаляційного впливу ЕХГ в експерименті – $17,35 \text{ мкм} \pm 1,09$, що на 21,21 % нижче.

Секреторні відділи сім'яних пухирців в віковій групі статевозрілих щурів контрольної серії заповнені густим секретом, а слизова оболонка головних протоків сім'яних пухирців вистелена циліндричним епітелієм. Площа секреторних відділів значно збільшена за рахунок численних складок епітелію. Інтерстицій сім'яних пухирців містить значну кількість гладком'язових волокон, що розташовані в добре розвиненій пухкій волокнистій сполучній тканині. На

1, 7 та 15 доби після припинення дії ЕХГ у щурів відповідних груп спостерігалась наявність секреторних відділів без секрету, деякі відділи зі зменшенням кількості складок слизової оболонки, зі зруйнованим епітелієм та рясним скупченням тубуло-альвеолярних клітин в просвіті секреторних відділів. Висота епітелію сім'яних пухирців щурів I серії протягом експерименту значно змінюється. В перші три терміни (1, 7, 15 доби) відмічається максимальне зменшення цього показника у щурів, що зазнавали впливу ЕХГ в експерименті. Так, на 1 добу висота епітелію становила 13,15 мкм, що нижче показника контролю на 20,3 % ($p=0,005$); на 7 добу експерименту висота епітелію була нижче на 3,28 мкм, що на 20,12 % ($p=0,001$) менше даних контрольної однойменної групи; на 15 добу після припинення дії ЕХГ щури 3 групи мали середній показник висоти епітелію сім'яного пухирця на рівні 12,89 мкм, що при порівнянні із контрольними даними відповідної групи складало 80,42 % ($p=0,015$).

Висновки. При отруєнні ЕХГ розвиваються порушення ендокринного статусу експериментальних тварин, що проявляються в помітному гальмуванні сперматогенезу на рівні утворення сперматид. Гонадотоксична дія ЕХГ проявляється у зменшенні в тестікулярній тканині кількості спермій та клітин різних етапів сперматогенезу. Кількість клітин Лейдига і Сертолі знижується разом зі зниженням індексу сперматогенезу, спостерігається масова їх вакуолізація. За умов впливу ЕХГ відбуваються однотипні зміни в гістологічній будові простати та сім'яних пухирців. Характерним є метаплазія епітелію, масивне злущення клітин поверхневого шару, інтерстиціальний набряк.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть пов'язані з вивченням гістологічної будови органів статевої системи після інгаляційного впливу толуолу на організм щурів різних вікових груп.

Література

1. Давыдова Н. С. Роль генетических маркеров крови АВО-HLA-систем в формировании повышенной чувствительности организма к производственному аллергену эпихлоргидрину / Н. С. Давыдова, Г. М. Бодиенкова // Медицина труда и промышленная экология. – 2002. – № 11. – С. 16-19.
2. Долина Л. Ф. Загрязнение воздушной среды помещений неприятными запахами и методы их устранения / Л. Ф. Долина, Т. Т. Данько, В. В. Беляева // Экология и природоиспользование. – 2008. – Вып. 11. – С. 143-152
3. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной/эмбриональной токсичности (скрининговый метод) // Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС). – Москва, Стандартинформ. – 2013. – 18 с.
4. Мішалов В. Д. Про правові, законодавчі та етичні норми і вимоги при виконанні наукових морфологічних досліджень / В. Д. Мішалов, Ю. Б. Чайковський, І. В. Твердохліб // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 2. – С. 108-115.
5. Общие этические принципы экспериментов на животных: мат. I Национального конгресса по биоэтике. – К.: НАНУ, 2001. – 16 с.
6. Овчаренко В. В. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Morpholog» / В. В. Овчаренко, В. В. Маврич // Свідотство про реєстрацію авторського права на твір № 9604, дата реєстрації 19. 03. 2004.
7. Сєвко О. Л. Етичні аспекти біомедичних досліджень з використанням експериментальних тварин / О. Л. Сєвко // Третій національний конгрес з біоетики з міжнародною участю (8-11 жовтня 2007 р., м. Київ, Україна). – К., 2007. – С. 139-140.
8. Состояние перекисного окисления липидов в организме животных при воздействии летучих компонентов эпоксидных смол / К. Г. Каликин, И. Ю. Высоцкий, Т. Ф. Гречишкина [и др.] // Український медичний альманах. – 2008. – Том 11, № 6 (додаток). – С. 136.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes // Coun. of Europe, Strasbourg, 1986. -53p.

УДК 611. 63:57. 044

ГІСТОЛОГІЧНА БУДОВА ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ САМЦІВ ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ ЕПІХЛОРГІДРИНУ

Волошина І. С.

Резюме. У представленій роботі наведені дані про гістологічну будову внутрішніх органів репродуктивної системи статевозрілих щурів. Тварини знаходились в умовах впливу епіхлоргідрину у концентрації 10 мг/м³ протягом 60 днів (5 днів на тиждень / 5 годин на добу). Дані, отримані в ході дослідження, дозволяють стверджувати, що в умовах впливу ЕХГ розвивається порушення ендокринного статусу тварин, що проявляється в гальмуванні сперматогенезу на рівні утворення сперматид. Гонадотоксична дія ЕХГ проявляється у зменшенні кількості сперміїв та клітин різних етапів сперматогенезу. Зміни гістологічної будови простати та сім'яних пухирців характеризуються метаплазією епітелію, масивним злущенням клітин та інтерстиціальним набряком.

Ключові слова: репродуктивна система, епіхлоргідрин, щур.

УДК 611. 63:57. 044

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС САМЦОВ ПОСЛЕДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ ЭПИХЛОРИДРИНА

Волошина И. С.

Резюме. В представленной работе приведены данные о гистологическом строении внутренних органов репродуктивной системы половозрелых крыс. Животные находились в условиях влияния эпихлоргидрина в концентрации 10 мг/м³ в течение 60 дней (5 дней в неделю / 5 часов в сутки). Данные, полученные в ходе исследования, позволяют утверждать, что в условиях воздействия ЭХГ развивается нарушение эндокринного статуса животных, что проявляется торможением сперматогенеза на уровне образования сперматид. Гонадотоксическое действие ЭХГ проявляется уменьшением количества спермиев и клеток различных этапов сперматогенеза. Изменения гистологического строения простаты и семенных пузырьков характеризуются метаплазией эпителия, массивным слущиванием клеток и интерстициальным отеком.

Ключевые слова: репродуктивная система, эпихлоргидрин, крыса.

UDC 611. 63:57. 044

Changes in the Histological Structure of the Internal Organs of the Reproductive System of Immature Rats after Inhalation Exposure to Toluene

Voloshina I. S.

Abstract. In recent years, research attention is increasingly paid to the problems associated with the morphology of the reproductive system both in normal and under the influence of various factors in the experiment, because the reproductive system is sensitive to any changes in the environment. Human contact with chemicals also occurs in the home with some consumer goods, while in the new homes, where they can accumulate volatile components of building materials. One of these pollutants is epichlorohydrin (ECH).

Sixty male laboratory albino rats were obtained from Lugansk State Medical University Laboratories (Lugansk, Ukraine). When received, the subjects were 12 weeks of age and weighed 130-150 g. The test animals were exposed to target concentrations of 0 (air control) and 10 mg/m³ of toluene in air for 5 hours/day, 5 days/week, for 2 month. Each series of animals was divided into five groups (6 rats each) in accordance with the term of output animals from experiment 1, 7, 15, 30 and 60 days after cessation of exposure of toluene.

At the end of the experiment the animals were weighed on laboratory scales and taken out of the experiment by decapitation under ether anesthesia. Authorities confiscated a single set of surrounding adipose tissue and weighed with an accuracy of 1 g by laboratory scale ВЛА-200. Organs fixation was performed in 10% neutral formalin solution, followed by washing in running water and dehydration in increasing concentrations of alcohol battery by commonly accepted method. Material embedded in paraffin blocks. Sections obtained thickness 4-5 mm. Staining was carried out with hematoxylin-eosin. Numeric data for each series A p value of < 0.05 was regarded as significant. Statistical analysis was performed by the Statistica for Windows 6.0 software.

The diameter of the seminiferous tubules is significantly reduced. So, on the first day after the termination of the ECH in rats of group 1 tubule diameter was 214.12 μm, which is 19.3% lower than in the control group (p = 0.007). Currently are decreases and the thickness of the epithelium of the tubules. For example, in the 2 groups of animals and the series is equal to 135.14 μm, compared with the data it controls below to 25.39% (p = 0.004). The Leydig cells relative number and diameter cores also significantly different from that of the control series. The relative number of Leydig cells in the animals of groups 1 and 2, and the series was less respectively 23.04% (p = 0.01) and 22.56% (p = 0.001), and the diameter of the nuclei of these cells – at 17.16% (p = 0.001) and 17.01% (p = 0.003). Index of spermatogenesis is also significantly different from control values. After the cessation of inhalation action

of ECH on epididymis in mature rats 1, 2, and 3 groups were observed tubules without the presence of sperm and tubules with eosinophilic conglomerates inside with dilated lumen.

The maximum diameter of the lumen of the duct deferens is increases and the thickness of the epithelium, on the contrary, decreases. At 7 and 15 days after cessation of inhalation rat ECH appropriate action groups had duct lumen size – 292. 64 and 277. 03 microns, more data control series in 14,21 % ($p = 0,047$) and 13. 75 % ($p = 0,01$).

In the rat prostate in experimental series 1, 2 and 3 groups were marked by interstitial edema, the devastation parts of the secretory glands, glandular epithelial desquamation, accumulation of cells in the lumen of the departments, a significant decrease in the height of epithelium and vacuolization of interstitium of prostate. The height of the epithelium of seminal vesicles of rats during experimental series varies considerably. In the first three terms (1, 7, 15 days) observed a maximum decrease of this index in rats exposed to ECH in the experiment.

Finally, the study shows that under the influence of ECH developing disorders of the endocrine animal's status manifested in the inhibition of spermatogenesis at the level of formation of spermatids. Gonadotoxic action of ECH appears to reduce the number of sperm cells. Changes in histological structure of the prostate and seminal vesicles are characterized by metaplasia of the epithelium, massive exfoliation of cells and interstitial edema.

Key words: reproductive system, epichlorohydrin, rat.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.

Стаття надійшла 15. 12. 2013 р.