

УДК: 616.681:547.262:599.23

Характер відновних процесів в яєчку щурів у різні терміни після припинення алкоголізації

Б.В.Грицуляк, В.Б.Грицуляк, М.Б.Пастух, І.Й.Івасюк, Н.П.Долинко

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника» (Івано-Франківськ, Україна)
ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» (Івано-Франківськ, Україна)
neonila.d@i.ua

Досліджено гістологічні і ультраструктурні зміни в яєчках 27 лабораторних щурів у різні терміни після припинення затравки тварин етанолом. Встановлено, що відновні процеси у звивистих сім'яних трубочках яєчка спостерігаються в умовах двотижневого експерименту і проявляються достовірним збільшенням кількості статевих клітин, що розвиваються. Збільшення терміну алкоголізації тварин до 3 тижнів різко знижує відновні процеси у звивистих сім'яних трубочках. Спостерігається виражене зниження кількості сперматоцитів, сперматид та об'єму ядер інтерстиційних ендокриноцитів.

Ключові слова: яєчко, етанол, відновні процеси.

Характер восстановительных процессов в яичке крыс в различные сроки после прекращения алкоголизации

Б.В.Грицуляк, В.Б.Грицуляк, М.Б.Пастух, І.Й.Івасюк, Н.П.Долинко

Исследованы гистологические и ультраструктурные изменения в яичках 27 лабораторных крыс в различные сроки после прекращения затравки животных этанолом. Установлено, что восстановительные процессы в извитых семенных трубочках яичка наблюдаются в условиях двухнедельного эксперимента и проявляются достоверным увеличением количества развивающихся половых клеток. Увеличение срока алкоголизации животных до 3 недель резко снижает восстановительные процессы в извитых семенных трубочках. Наблюдается выраженное снижение количества сперматоцитов, сперматид и объема ядер интерстициальных эндокриноцитов.

Ключевые слова: яичко, этанол, восстановительные процессы.

The nature of restorative processes in the testes of rats at different periods after cessation of alcohol abuse

B.V.Hrytsulyak, V.B.Hrytsulyak, M.B.Pastuh, I.J.Ivasiuk, N.P.Dolynko

Histological and ultrastructural changes in testes among 27 laboratory rats at different periods after termination of ethanol administration have been studied. It has been established that recovery processes in convoluted seminiferous tubules of testes are observed in terms of the two-week experiment and significant increase in the number of developing germ cells has been shown. Increase of alcohol abuse up to 3 weeks dramatically reduces recovery processes in convoluted seminiferous tubules. Marked decrease of spermatocytes and spermatids number and volume of interstitial nuclei endocrinocytes has been revealed.

Key words: testis, ethanol, recovery processes.

Вступ

Відомо, що зловживання алкоголем призводить до ураження багатьох органів і, зокрема, яєчок, у зв'язку із високою чутливістю їх паренхіми до впливу різноманітних зовнішніх і внутрішніх факторів (Гладкова, 2013). Тривале зловживання спиртними напінками може порушити сперматогенез та знизити репродуктивну функцію у зв'язку із зменшенням у цих умовах біосинтезу тестостерону (Спаська, 2010; Schill et al., 2011).

Разом з тим особливості відновних процесів в яєчках в умовах припинення алкоголізації організму досліджені неповно, що і послужило метою даної експериментальної роботи.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконані на 27 статевозрілих білих лабораторних щурах-самцях, яким внутрішньошлунково вводили 30% розчин етанолу з розрахунку 2 мл на 100 г маси тіла тварин

протягом 7, 14, 21 доби один раз на добу. Контрольну групу склали щури, яким у тому ж віці внутрішньошлунково вводили воду, яку застосовували для розведення етанолу (Дереча, 2007). Утримання і маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до положення «Загальні етичні принципи експериментів над тваринами», затвердженого 1 Національним конгресом з біоетики (2011 р). Комісією з питань біоетики Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи виявлено не було (протокол № 1 від 04.02.2014 р.).

Тканини яєчка для гістологічного і електронномікроскопічного дослідження забирали через 7, 14 та 21 добу після припинення затравки тварин етанолом. Тканини яєчка фіксували в рідині Буена і в Ценкер-формолі. Парафінові зрізи товщиною 5–7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином та реактивом Шифф-йодна кислота з дофарбовуванням гематоксиліном Ерліха.

При мікроскопічному дослідженні для кожної серії тканин визначали діаметр звивистих сім'яних трубочок, ступінь пошкодження клітин сперматогенного епітелію, кількість клітин, що зустрічаються на VII стадії циклу сперматогенного епітелію, та об'єм ядер інтерстиційних ендокриноцитів. Електронномікроскопічне дослідження структур яєчка проводили за загальноприйнятою методикою. Зрізи вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125 К із наступним фотографуванням при збільшенні від 4000 до 16 000 разів.

Статистичний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної системи STATISTICA for Windows®, попарне порівняння результатів здійснювали методами непараметричного аналізу з використанням критерію Манна-Уїтні. Різницю між показниками вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати

Отримані нами дані на 21 добу після алкоголізації тварин протягом 7 діб свідчать про те, що діаметр звивистих сім'яних трубочок та об'єм ядер інтерстиційних ендокриноцитів не відрізняються від названих показників у тварин контрольної групи. Власна оболонка звивистих сім'яних трубочок також зберігає звичайну будову. До її базальної мембрани концентричними шарами прилягають клітини сперматогенного епітелію, що знаходяться на різних стадіях циклу сперматогенного епітелію, а в просвіті сім'яних трубочок наявні сперматозоїди. Звичайну будову зберігають 97% звивистих сім'яних трубочок, і тільки в 3% сім'яних трубочок має місце легкий ступінь пошкодження клітин (рис. 1), що, на нашу думку, може бути проявом апоптозу. На 21 добу відновних процесів після однотижневої етанолової інтоксикації тварин значних ультраструктурних змін у стінці гемокапілярів та власній оболонці звивистих сім'яних трубочок нами не виявлено, однак у частині мітохондрій має місце просвітлення їх матриксу, фрагментація гребенів та помірне розширення каналців ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі. В ендотеліюцитах гемокапілярів, міоїдних клітинах і підтримувальних епітеліюцитах ультраструктура ядер та цитоплазматичних органел близька до норми. З'єднувальний апарат цих підтримувальних епітеліюцитів має звичайну будову. Але в цитоплазмі сперматоцитів і сперматид спостерігається просвітлення цитоплазматичного матриксу, часткова редукація гребенів мітохондрій та розширення каналців ендоплазматичної сітки. Такого ж характеру ультраструктурні зміни наявні в інтерстиційних ендокриноцитах.

Через 21 добу після припинення двотижневої алкоголізації тварин переважна більшість звивистих сім'яних трубочок (82,4%) зберігають звичайну будову, тоді як без реабілітаційного періоду цей показник є значно меншим (67,2%). Легкий ступінь пошкодження клітин сперматогенного епітелію виявлено у 14,1% звивистих сім'яних трубочок, що майже у 2 рази менше (26,3%), порівнюючи з алкоголізацією тварин. Вдвічі менше (3,5% проти 6,5%) виявлено звивистих сім'яних трубочок з важким ступенем пошкодження клітин сперматогенного епітелію. Деяко більшою на цей термін реабілітації є кількість сперматоцитів на стадії пахітени та сперматид 7 етапу розвитку ($274,27 \pm 2,83$ та $894,29 \pm 4,23$ проти 241 ± 24 та $846,57 \pm 11,61$ відповідно). Статистично достовірною ($p < 0,05$) є різниця в об'ємах ядер інтерстиційних ендокриноцитів. Упродовж двотижневої реабілітації тварин після їх 14-добової алкоголізації ядра ендотеліюцитів гемокапілярів з нерівномірно розширеним перинуклеарним простором, люмінальна поверхня клітин з явищами мікроклазматозу. Електронна щільність матриксу мітохондрій зменшується, каналці ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі і базальна мембрана гемокапілярів розширені.

У власній оболонці звивистих сім'яних трубочок неклітинні шари потовщені, ядра міоїдних клітин – з периферичною конденсацією хроматину, каналці ендоплазматичної сітки і елементи комплексу Гольджі розширені, матрикс мітохондрій просвітлений. Базальна мембрана

сперматогенного епітелію нерівномірно потовщена.

Ядро підтримувальних епітеліоцитів неправильної форми з дифузним хроматином, перинуклеарний простір нерівномірно розширений, цитоплазма світла із значною кількістю мікропіноцитарних пухирців. Мітохондріальні гребені редуковані, матрикс мітохондрій просвітлений, цистерни ендоплазматичної сітки розширені. В з'єднувальному апараті підтримувальних епітеліоцитів цитолемі розміщені паралельно, ширина міжклітинного простору незмінна, мікрофіламенти редуковані, цистерни ендоплазматичної сітки розширені. Ядро інтерстиційних ендокриноцитів неправильної форми, хроматин конденсований біля каріолеми, цитоплазма багата жировими включеннями, в мітохондріях гребені редуковані.

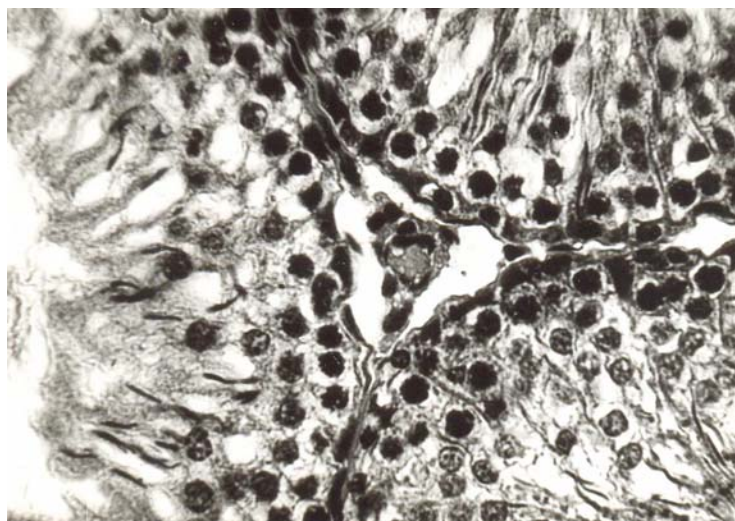


Рис. 1. Звивисті сім'яні трубочки яєчка щура на 21 добу після припинення алкоголізації протягом одного тижня. Просвітлення цитоплазми клітин сперматогенного епітелію. Забарвлення зрізів гематоксиліном і еозином. Зб.: × 400

На 21 добу після тритижневої алкоголізації тварин нами виявлено, що звичайну гістологічну будову зберігають тільки 47,3% звивистих сім'яних трубочок проти 31,3% трубочок у тварин без реабілітаційного періоду. Їх діаметр становить $232,20 \pm 2,60$ мкм проти $221,17 \pm 2,40$ мкм у контролі. Легкий ступінь пошкодження клітин сперматогенного епітелію має місце у 33,4% проти 24,5% звивистих сім'яних трубочок, важкий ступінь пошкодження клітин – у 16,3% проти 34,0%, та 3,0% проти 10,2% спустошених сім'яних трубочок (рис. 2). В умовах реабілітації тварин спостерігається різниця в об'ємі ядер інтерстиційних ендокриноцитів ($78,37 \pm 2,41$ мкм³ проти $69,26 \pm 4,62$ мкм³) відповідно.

В умовах реабілітації тварин на 21 добу після алкоголізації нами виявлено достовірне збільшення у звивистих сім'яних трубочках ($p < 0,05$) кількості сперматоцитів на стадії пахітени $244,12 \pm 3,28$ проти $218,29 \pm 4,74$ та сперматид 7 етапу розвитку $791,35 \pm 5,20$ проти $768,51 \pm 6,40$.

Через 21 добу після припинення алкоголізації тварин протягом трьох тижнів ультраструктурні зміни в яєчках мають виражений характер. Зокрема, в ендотеліоцитах гемокапілярів спостерігається інвагінація нуклеолеми, зниження електронної щільності нуклеоплазми та розширення перинуклеарного простору. В мітохондріях – фрагментація гребенів та просвітлення матриксу. Базальна мембрана сперматогенного епітелію звивистих сім'яних трубочок розширена. Контури ядер міоїдних клітин нерівні, перинуклеарний простір розширений, цитоплазма вакуолізована, цитоплазматичні органели з явищами деструкції. Ультраструктурні зміни у підтримувальних епітеліоцитах проявляються просвітленням нуклео- і цитоплазми з деформацією цитоплазматичних органел. В з'єднувальному апараті клітин має місце розходження цитолем, редукція мікрофіламентів та нерівномірне розширення каналців ендоплазматичної сітки (Meng et al., 2005; Pareira et al., 2002).

В інтерстиційних ендокриноцитах – розширення перинуклеарного простору, нерівність контурів ядра, виражена вакуолізація цитоплазми та деструкція цитоплазматичних органел.

В літературі наявні повідомлення про структурно-функціональні зміни в яєчках внаслідок хронічної дії алкоголю, але відновлювальні процеси досліджені неповно. За нашими спостереженнями,

через три тижні після алкоголізації щурів протягом одного тижня суттєвих гістологічних і електронномікроскопічних змін з боку гематотестикулярного бар'єру і звивистих сім'яних трубочок не відбувається.

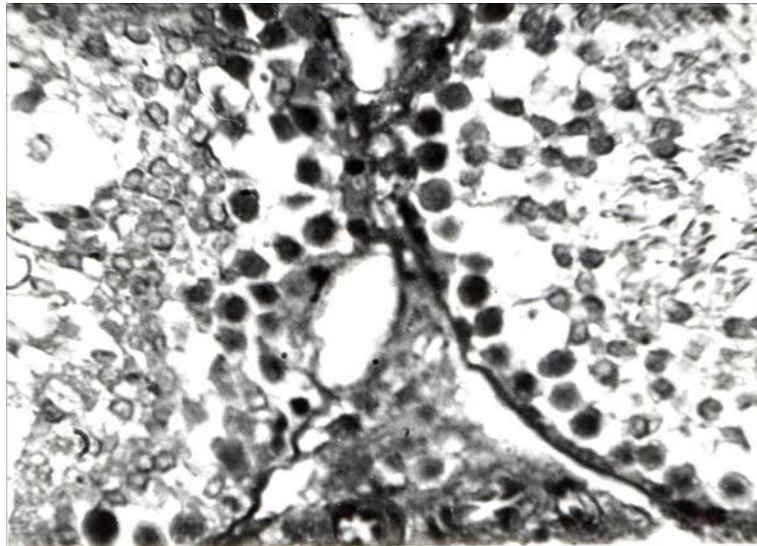


Рис. 2. Деформація звивистих сім'яних трубочок з редукцією шарів сперматогенного епітелію в яєчку щурів на 21 добу після припинення алкоголізації тварин протягом трьох тижнів. Забарвлення зрізів гематоксиліном і еозином. Зб.: × 400

При дослідженні гістологічних мікропрепаратів яєчок алкоголізованих тварин упродовж 14 і 21 доби через три тижні реабілітаційного періоду в інтерстиції виявлено наявний набряк, причиною якого можуть бути ультраструктурні зміни в компонентах гематотестикулярного бар'єра – стінці гемокапілярів, власній оболонці звивистих сім'яних трубочок і підтримувальних епітеліоцитах та вихід з гемокапілярів білків плазми під дією алкоголю, що служить причиною циркуляторної гіпоксії тканин яєчка (Спаська, 2010).

Отримані нами результати свідчать про те, що відновлювальні процеси в яєчках алкоголізованих тварин після припинення дії алкоголю можливі за умови недовготривалої інтоксикації. При збільшенні терміну дії алкоголю до двох тижнів інтенсивність відновних процесів знижується, а при більш тривалому впливі алкоголю (три тижні) регенеративні зміни в яєчках піддослідних тварин спостерігаються в поодиноких звивистих сім'яних трубочках.

Обговорення

Повідомлення в літературі про структурно-функціональні зміни у внутрішніх органах, в тому числі в яєчках, внаслідок хронічної дії етанолу зустрічаються відносно часто (Schill et al., 2011), але динаміка відновних процесів у них після припинення дії алкогольної інтоксикації досліджена неповно. Отримані нами дані про стан сперматогенного епітелію у звивистих сім'яних трубочках яєчка через 21 добу після однотижневої алкоголізації тварин свідчать, що вони нагадують собою гістологічну картину сім'яних трубочок у контрольних тварин. Зміни, які виявлено у цих умовах в ультраструктурах компонентів гематотестикулярного бар'єра, є короточасними і на 21 добу після відміни етанолу не визначаються, а сперматогенез нормалізується. При дослідженні звивистих сім'яних трубочок через 21 добу після двотижневої алкоголізації тварин нами спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) зменшення у них кількості сперматоцитів на стадії пахітени та сперматид 7 етапу розвитку, котрі виявились більш чутливими до дії етанолу (Prince, 2002; Siu, Cheng, 2004).

Ще нижчими виявились відновні процеси у звивистих сім'яних трубочках яєчка на 21 добу після тритижневої алкоголізації тварин, що свідчить про їх залежність від тривалості дії етанолу.

Отримані нами дані про ультраструктурні зміни в компонентах гематотестикулярного бар'єра (стінці гемокапілярів, власній оболонці звивистих сім'яних трубочок, підтримувальних епітеліоцитах та їх з'єднувальному апараті) свідчать про появу умов для порушення його проникності та розвитку аутоімунного орхіту (Степанець, 2013).

Висновки

1. Відновні процеси в яєчках хронічно алкоголізованих щурів спостерігаються через один та два тижні після припинення дії алкоголю. Епітелій звивистих сім'яних трубочок та структура компонентів гематотестикулярного бар'єра наближається до норми.
2. Збільшення терміну дії етанолу до трьох тижнів різко знижує інтенсивність відновних процесів в яєчках піддослідних тварин із вірогідно нижчими показниками кількості сперматоцитів, сперматид та об'єму ядер інтерстиційних ендокриноцитів.

Список літератури

- Гладкова А.И. Андрологические проявления стресса. – Харьков: С.А.М., 2013. – 267с. /Gladkova A.I. Andrologicheskiye proyavleniya stressa. – Kharkov: S.A.M., 2013. – 267s./
- Дережа Л.М. Склад фосфоліпідів клітин крові, печінки та головного мозку тварин при тривалій дії етанолу // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2007. – Вип.5, №768. – С. 25–28. /Derecha L.M. Sklad phospholipidiv klityn krovi, pechinky ta golovnoho mozku tvaryn pry tryvaliy dii etanolu // Visnyk Kharkivskogo natsionalnogo universyteu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2007. – Vyp.5, №768. – S. 25–28./
- Спаська А.М. Вплив орхоепідидиміту на ультраструктуру паренхіми яєчка чоловіків зрілого віку // Галицький лікарський вісник. – 2010. – Т.17, №2, ч.1. – С. 94–97. /Spaska A.M. Vplyv orkhoepidydimytu na ultrastrukturu yayechka cholovikiv zrilogo viku // Galytskyi likarskyi visnyk. – 2010. – T.17, №2, ch.1. – S. 94–97./
- Степанець І.О. Отримання та характеристика імуноглобулінів класу G із сироватки крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією // Медична хімія. – 2013. – Т.15, №1. – С. 72–75. /Stepanets O.I. Otrymannya ta kharakterystyka imunoglobuliniv klasu G iz syrovatky krovi shchuriv z khronichnoyu alkoholnoyu intoksykatsiyeyu // Medychna khimiya. – 2013. – T.15, №1. – S. 72–75./
- Meng J., Holderaft R., Schima J. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – №102 (46). – P. 16696–16700.
- Parreira G.G., Mele R.C.N., Russell L.D. Relationship of Sertoli-Sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in convectional and en face views // Biol. Reprod. – 2002. – №67 (4). – P. 1232–1241.
- Prince F.P. Jamellar and Tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae represent in steroid-producing cells // Mitochondrion. – 2002. – №1 (4). – P. 381–389.
- Schill W.B., Comhaire F.N., Hargreave T.B. Andrology for the clinician. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. – 800s.
- Siu M.K., Cheng C.Y. Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis // Biol. Reprod. – 2004. – №71 (2). – 375–391.

Представлено: О.І.Дельцова / Presented by: O.I.Del'tsova

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 07.04.2014