УДК: 611.636/637:57.044

І.С. Волошина

УЛЬТРАСТРУКТУРА СІМ'ЯНИКІВ І ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ ЕПІХЛОРГІДРИНУ

Державний заклад «Луганський державний медичний університет»

Волошина І.С. Ультраструктура сім'яників і передміхурової залози статевозрілих щурів після інгаляційного впливу на організм епіхлоргідрину // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 17-20.

У представленій роботі наведені дані про будову сім'яників та передміхурової залози статевозрілих щурів на ультрамікроскопічному рівні, які в експерименті зазнавали впливу епіхлоргідрину. Дані, отримані в ході дослідження, дозволяють стверджувати, що в умовах впливу на організм вказаного екополютанту відзначаються значні зміни в будові органів, що вивчались. Так, має місце розширення цистерн ендоплазматичної сітки клітин сперматогенного епітелію, формування великих вакуолей, деформація сперматид, збільшення кількості апоптозу клітин простати.

Ключові слова: сім'яники, передміхурова залоза, епіхлоргідрин, щур.

Волошина И.С. Ультраструктура семенника и предстательной железы половозрелых крыс после ингаляционного воздействия на организм эпихлоргидрина // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 17-20.

В представленной работе приведены данные о строении семенников и предстательной железы половозрелых крыс на ультрамикроскопическом уровне, которые в эксперименте подвергались воздействию эпихлоргидрина. Данные, полученные в ходе исследования, позволяют утверждать, что в условиях влияния на организм указанного экополлютанта происходят значительные изменения в строении изучаемых органов. Так, имеет место расширение цистерн эндоплазматической сети клеток сперматогенного эпителия, формирование больших вакуолей, деформация сперматид, увеличение количества апоптоза клеток простаты.

Ключевые слова: семенники, предстательная железа, эпихлоргидрин, крыса.

Voloshina I.S. Ultrastructure of the testis and prostate of mature rats after inhalation exposure of epichlorohydrin // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 17-20.

In the present study presents data on the structure of the testes and prostate of mature rats on ultramicroscopic level, which in the experiment were exposed to toluene. Data obtained in the study suggest that in terms of the effect on the body mentioned on the chemical agent is significant changes occur in the structure of the investigated organs. So, there are increased cisterns of the endoplasmic reticulum of spermatogenic epithelium, the formation of large vacuoles, deformation of spermatids, increasing the number of apoptosis of prostate cells.

Key words: testes, prostate, epichlorohydrin, rat.

Вступ. Широко відомо, що репродуктивна система є однією з найчутливіших систем організму, що жваво реагує на забруднення оточуючого середовища, яке характеризується довготривалою та малою інтенсивністю дії несприятливих факторів. Разом з прогресивним зростом рівня забрудненості оточуючого середовища спостерігається зниження якості сперми чоловіків та тварин. Одними з основних забруднювачів навколишнього середовища є ксенобіотики, особливе місце серед яких займають епоксидні смоли, які широко застосовуються в народному господарстві, в авто- та суднобудуванні, нафтової промисловості; використовуються для одержання лакофарбових покриттів, клеїв, ливарних та просочувальних компаундів [1, 2, 7]. Головним сировинним продуктом останніх є епіхлоргідрин, що має мутагенну дію, яка проявляється значним підвищенням хромосомних аберацій [9].

Дія епіхлоргідрину на репродуктивну систему щурів в літературі висвітлена недостатньо, це послужило основою для початку вивчення впливу зазначеного ксенобіотика на морфогенез внутрішніх органів статевої системи щурів в експерименті.

Зв'язок з науковими темами і планами. Презентована робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень ДЗ «ЛугДМУ» та є частиною наукової теми кафедри анатомії людини «Морфогенез органів ендокринної, імунної та кісткової систем під хронічним впливом летучих компонентів епоксидних смол» (номер державної реєстрації – 0109U004615).

Мета дослідження полягає у вивченні мікроскопічної будови сім'яників та передміхурової залози статевозрілих щурів у віддалені терміни після інгаляційного впливу епіхлоргідрину.

Матеріал і методи. 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 [10], згідно стандарту ідентичному міжнародному документу OECD Test № 421 «Reproduction / Developmental Toxicity Screening Test» (ОЕСР Тест № 421 «Скринінгове дослідження репродуктивної/ембріо-

нальної токсичності») [3] та вимогам Міжнародного комітету з лабораторних тварин, Міжнародної федерації з захисту тварин та вітчизняними інструктивними документами [6], а також 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 ІІ). Контрольну серію (К) складали інтактні щури. Серія І була представлена щурами, які зазнавали інгаляційного впливу толуолу у концентрації 10 мг/м^3 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 підтримувалась 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 епіхлоргідрину.

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.

Для електронно-мікроскопічного дослідження використовували сім'яники та передміхурові залози статевозрілих щурів на 1, 7, 30, та 60 доби після закінчення експерименту. Шматочки сім'яників та передміхурової залози, розміром не більше 1 мм^3 фіксували в 2,5% глютаральдегідному фіксаторі за Карновським протягом 1 години з наступною фіксацією в 1% тетроксиді осмію за Паладе [8]. Після дегідратації в розчинах етанолу зростаючої концентрації та абсолютному ацетоні матеріал заливали сумішшю епоксидних смол (епон-араддит) та полімеризували при температурі +60°С протягом 36 годин. Ультратонкі зрізи товщиною 0,5-1,5 мкм виготовляли на ультрамікротомі УМТП-4 Сумського виробничого об'єднання «Електрон» (Україна). Зрізи контрастували 2% розчином уранілацетату на 70° спирті і цитраті свинцю по Рейнольдсу та роздивлялись в електронному мікроскопі ЕМ-125 тієї ж марки з наступним фотографуванням при збільшеннях від 2000 до 25000 разів і зберіганні у вигляді негативних і позитивних фотознімків.

Напівтонкі зрізи отримували на ультратомі LKB-III з блоків, підготовлених для електронної мікроскопії. Забарвлювали 1% лужним розчином толуїдинового синього та досліджували за допомогою світлооптичної системи «Olympus».

Результати дослідження. В більшості сім'яних канальців тварин, які в експерименті зазанавали інгаляційного впливу епіхлоргідрину, застосування методу електронної мікроскопії показало значні зміни у всіх клітинах сперматогенного шару. Так, базальна мембрана сім'яного канальця стовщена, спостерігаються явища розволокнення колагенових волокон (рис. 1 А). Численні сперматогонії контактують з клітинами Сертолі. Деякі сперматогонії мають нерівномірний розподіл цитоплазми. Досить частим проявом цього є дегенерація клітин з наявністю пікнотичних ядер. Клітини з дегенеративними змінами зустрічаються все частіше, ніж клітини з проявами апоптозу. Дегенеративні зміни клітин герміногенного епітелію деінде сягають такої межі, що ускладнює ідентифікацію окремих видів клітин.

Дослідження сперматоцитів щурів характеризується наявністю в цих клітинах вакуолізації цитоплазми (рис. 1 Б). Ядра сперматоцитів виявляються незміненими, за винятком зменшення кількості та нечіткості контурів синаптонемальних комплексів. Зустрічаються деструктивно змінені сперматоцити, цитоплазма яких набряклою, електронно нещільною з розширеними канальцями ендоплазматичної сітки без рибосом.

У сперматогоніях щурів І серії спостерігається різного ступеня вакуолізація цитоплазми. В переважній більшості клітин візуалізується розширення цистерн гладкого ендоплазматичного ретикулуму та руйнування крист мітохондрій. Відстань між клітинами у порівнянні з даними тварин контрольної серії збільшується, що свідчить про набряк тканини. Ексудація та набряк тканини спостерігаються не лише між сім'яними канальцями, але й між сперматогенними клітинами. На загибель клітин вказують пустоти, які знаходяться між клітинами сперматогенного шару. Сперматиди, що мають округлу форму, часто в своєму складі мають 2-3 ядра. Деякі з них з вузькою ділянкою цитоплазми у місці контакту з розташованою поруч клітиною. Зміни, які не було виявлено на світлооптичному рівні, спостерігалися при застосуванні трансмісійної електронної мікроскопії. Деформація сперматид мала місце як у головній, так і у хвостовій частинах клітин. У незначній кількості сперматид було знайдено декілька аксонем, що оточені однією цитоплазмою хвоста з фрагментацією фіброзної оболонки. Це свідчить про те, що ці клітини – зрілі сперматиди. Ядра їх різної форми з ділянками різної електронної щільності та наявністю того чи іншого виду хроматину, в цитоплазмі багато вакуолей. Деякі простори між клітинами Сертолі та сперматидами мають ознаки електронної прозорості. У відростку апікальної частини клітин Сертолі, який охоплює зрілий сперматид, спостерігається фокальна деформація ендоплазматичного ретикулуму, а органели скупчуються одна біля одної. З іншого боку, окремі сустентоцити мають електронно нещільну цитоплазму та невелику кількість органел, що розкидані по всій площі клітини.

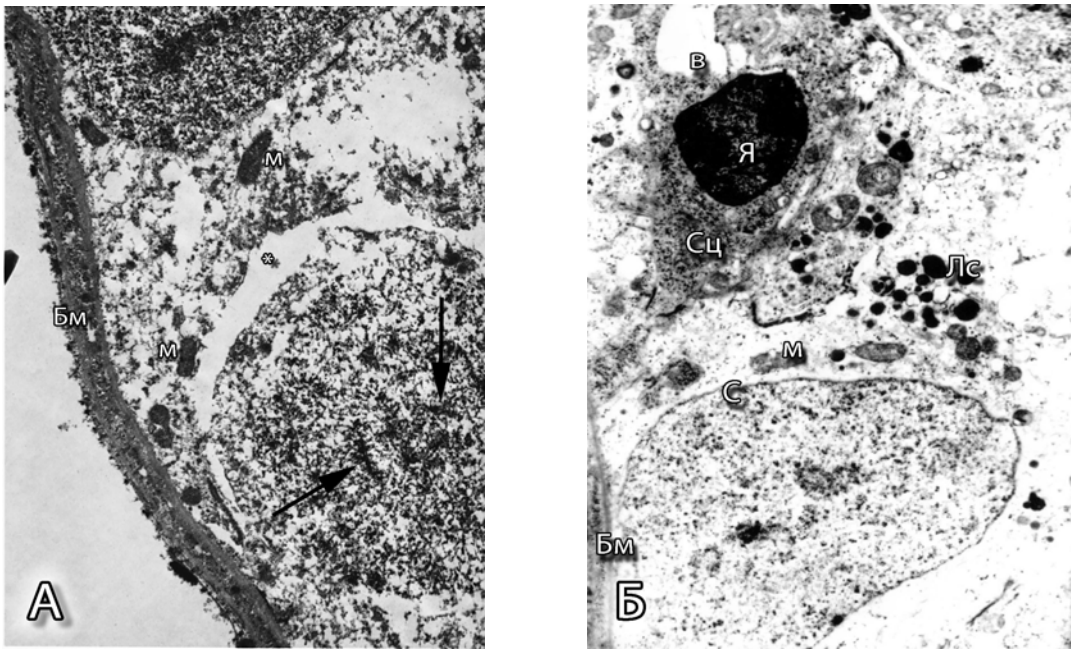

Рис. 1. А. Базальна частина сім'яного канальця щура І серії. Бм – базальна мембрана; в – вакуоль; м – мітохондрії. Б. Сперматоцит та клітина Лейдіга. Бм – базальна мембрана; в – вакуоль; Лс – лізосома; м – мітохондрія; С – клітина Сертолі; Сц – сперматоцит; Я – ядро сперматоцита.

В сустентоцитах, крім збільшення кількості вакуолей, спостерігається збільшення кількості лізосом. Відростки цих клітин дещо скорочені. Це призводить до того, що сперматоцити більшою мірою контактують один з одним. Трансмісійна електронна мікроскопія сім'яників тварин, які зазнавали впливу епіхлоргідрину, показала руйнування контактів між клітинами Сертолі. Таким чином кількість контактів між клітинами Сертолі та клітинами сперматогенного шару значно зменшується. У клітинах Сертолі вміст ліпідних включень та лізосом збільшується, з'являються мультивезикулярні тільця, що розцінюється, як активація дезінтоксикаційних процесів, що відбуваються у клітині.

Клітини Лейдіга мають ознаки дегенеративних змін у вигляді маргінації хроматину та збільшення розмірів вакуолей. В інших клітинах мітохондрії мають змінену форму. Кількість мікроворсинок клітин Лейдіга зменшена.

На електронограмах передміхурової залози щурів, які в експерименті зазнавали інгаляційного впливу епіхлоргідрину, спостерігаються зміни як залозистого, так і стромального компонентів простати. Вакуолізація цитоплазми секреторних епітеліоцитів і розширення цистерн їх ендоплазматичного ретикулуму свідчать про функціональні зміни субклітинних структур залози та підвищення рівня секреторної активності клітин. Ядра гландулоцитів виглядають менш електронно щільними, а шар крайового хроматину є тоншим, ніж у щурів контрольної серії. Проте, розмір ядерець збільшений. В цитоплазмі має місце досить велика кількість рибосом. Комплекс Гольджі з великою кількістю вакуолей, що свідчить про високий ступінь його функціональної активності. У просвіті ацинуса передміхурової залози статевозрілих щурів І серії, біля апікальної частини гландулоцитів візуалізуються фрагменти, що відокремились від клітин (апокриновий тип секреції) (рис. 2). На субклітинному рівні інгаляційний вплив епіхлоргідрину призводить до деструктивних змін біологічних мембран та підсилення процесів аутофагії. У цитоплазмі клітин формуються вакуолі, з елементами зруйнованих мембранних органел. Крім того спостерігається розширення міжклітинних просторів. Спостерігається збільшення випадків апоптозу гландулоцитів та явища фагоцитозу. Деякі з клітин, які самостійно загинули можна знайти в просвіті залози вдостатньо великій кількості. Апоптичні клітини містять цитоплазматичні тіла, що включають елементи мітохондрій, гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, комплексу Гольджі з асоційованими везикулами та фрагментованим гетерохроматином у вигляді півмісяця.

Базальні епітеліоцити є не такими чисельними, як секреторні клітини. Вони мають форму трикутника, що своєю основою лежить на базальній мембрані. Цитоплазма базальних епітеліоцитів має низьку електронну щільність. Синтетичний апарат в клітинах розвинений слабко.

Міоцити стромального компартменту залози мають видовжену форму. В їх цитоплазмі зустрічаються стрічки скорочення вздовж актинових міофіламентів. Між міоцитами та базальною мембраною епітеліального шару знаходяться колагенові та еластичні волокна. В стромальному компартменті залози збільшується кількість клітин з ознаками підвищеної секреторної активності, біля яких розташовані колагенові волокна з характерною поперечною посмугованістю. Таким чином, має місце початкова стадія фіброзування строми передміхурової залози.

Висновки: В ході проведеного дослідження нами було встановлено, що інгаляційний вплив на організм статевозрілих щурів епіхлоргідрину викликає значні зміни у всіх клітинах спермато-

генного шару та передміхуровій залозі. Частим проявом дії екзогенного фактора є значне розширення цистерн ендоплазматичної сітки з формуванням на їх місці великих вакуолей. Має місце деформація сперматид та їх передчасне вивільнення в просвіт сім'яного канальця. Кількість контактів між клітинами Сертолі та клітинами сперматогенного шару значно зменшується. На місцях загибелі клітин формуються пустоти. Спостерігається збільшення випадків апоптозу гландулоцитів простати з явищами фагоцитозу.

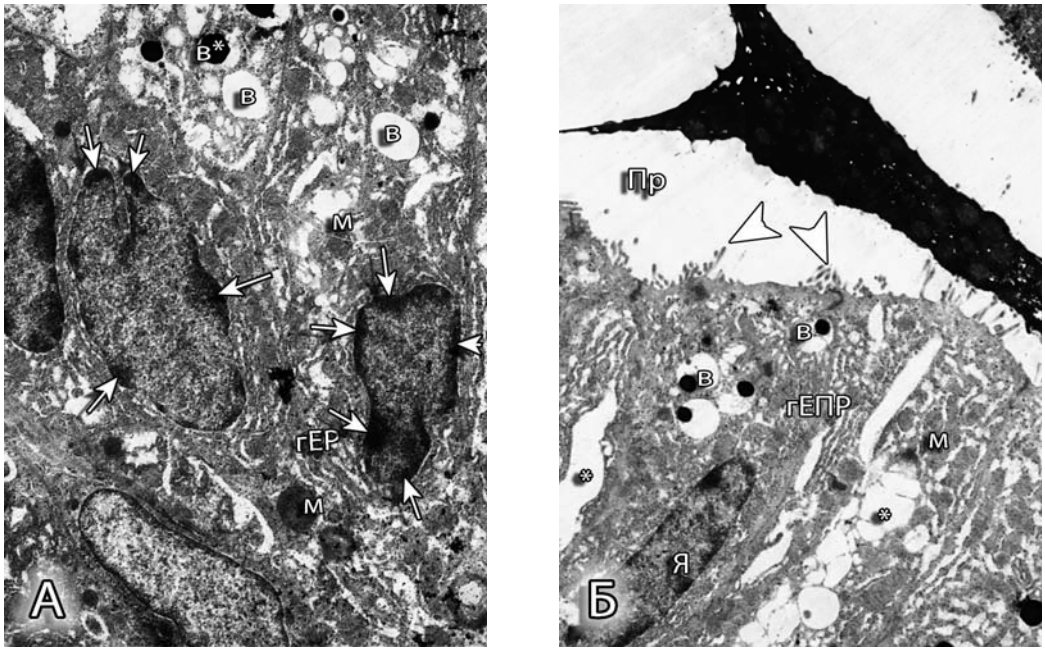

Рис. 2. А. Гландулоцити щура І серії. в – вакуолі без секрета; в* – вакуолі з секретом; гЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; м - мітохондрії; стрілочки - маргінація хроматина. Збільшення – Х5000. Б. Розширення цистерн ендоплазматичного ретикулуму гландулоцитів щура І серії. в – вакуолі з секретом; гЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; м - мітохондрії; Пр – просвіт залози; Я – ядро; * - розширення цистерн ендоплазматичного ретикулуму; стрілки - секреція. Збільшення – Х5000.

Перспективи подальших досліджень. Наступним дослідженням буде вивчення ультрамікроскопічної будови сім'яників та передміхурової залози статевозрілих щурів після інгаляційного впливу в експерименті толуолу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

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. К вопросу о нормировании модифицированной к вопросу о нормировании модифицированной эпоксидной смолы марки уп-666-4 в воздухе рабочей зоны / Т. Е. Теплова, Е. В. Богатырева, Я. Б. Ли, И. В. Василенко, В. В. Мухин // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2005. - № 2. – С.84-88.
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. І Национального конгресса по биоэтике. – К.: НАНУ. – 2001. – 16 с.
6. Сєвко О.Л. Етичні аспекти біомедичних досліджень з використанням експериментальних тварин / О.Л. Сєвко // Третій національний конгрес з білетики з міжнародною участю (8-11 жовтня 2007 р., м. Київ, Україна). – К., 2007. – С 139-140.
7. Состояние перекисного окисления липидов в организме животных при воздействии летучих компонентов эпоксидных смол / К. Г. Каликин, И. Ю. Высоцкий, Т. Ф. Гречишкина, М. О. Сиротина // Український медичний альманах. – 2008. - Том 11, № 6(додаток). – С. 136.
8. Electron microscopy in biology. A practical approach / [ed. by J. R. Harris]. — Oxford : IRL Press, 1991. — 305 p.
9. Epichlorohydrin in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. - World Health Organization, 2004. –15 p.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes // Coun. of Europe, Strasbourg, 1986.-53p.

Надійшла 23.11.2013 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін