

## МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЯЄЧОК В УМОВАХ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ ЕКСТРАКТОМ З ЛИСТЯ ГІНГГО БІЛОБИ

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»

(м. Івано-Франківськ)

Дослідження виконане відповідно до плану наукової роботи Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника і є частиною науково-дослідної теми кафедри анатомії і фізіології людини та тварин «Морфофункціональний стан кровоносного русла і тканинних елементів чоловічої статеві залози в умовах впливу патогенних факторів», № державної реєстрації 0105U009082.

**Вступ.** Безпліддя є актуальною проблемою, що має важливе соціальне значення. Відомо, що в структурі безплідного шлюбу чоловічий фактор становить понад 35% випадків [1, 2, 3]. Серед етіопатогенетичних чинників, які провокують розвиток безпліддя, а часто і статеву неспроможність, важливе місце займає хронічна алкогольна інтоксикація [5].

Це зумовлено високою чутливістю статевих клітин на різних стадіях розвитку до алкоголю та його метаболітів [4, 6]. Також під впливом етанолу порушується гормональна регуляція статевих функцій, а у хронічних алкоголіків встановлено зниження рівня чоловічих статевих гормонів [7, 8, 9]. В патогенезі алкогольного гіпогонадизму одне із провідних місць займає судинний фактор [8, 9], а враховуючи ангіопротекторні особливості екстракту з листя Гінгго білоби для профілактики розладів кровопостачання органів і тканин, метою даного дослідження було виявити корегуючі властивості рослини на сперматогенну і ендокринну функції яєчок в експерименті.

**Мета дослідження.** Визначити характер гістологічних та ультраструктурних змін в яєчку тварин в умовах хронічної алкогольної інтоксикації і стан реабілітаційних процесів, зумовлених застосуванням фітопрепарату – екстракту з листя Гінгго білоби.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведені на 42 статевозрілих лабораторних щурах-самцях масою 150-180 г. Утримання і маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до положення «Загальні етичні принципи експериментів над тваринами, затвердженого 1 Національним конгресом з біоетики (2001 р.). Комісією з питань біоетики Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол №1 від 04.02.2014 р.) Піддослідним тваринам внутрішньошлунково вводили 30% розчин етанолу з розрахунку 2 мл на 100 г маси тіла та екстракт з листя Гінгго білоби в дозі 0,5 мл на кг протягом 7, 14 і 21 доби. Гістологічні та ультрамікроскопічні зміни в яєчках щурів досліджували через 7, 14 та 21 добу від початку експерименту.

Тканини яєчка фіксували в рідині Буена і Ценкер-формолі. Парафінові зрізи товщиною 5-7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином та реактивом Шифф-йодна кислота з дофарбовуванням гематоксиліном Ерліха.

При мікроскопічному дослідженні тканин визначали діаметр звивистих сім'яних каналців, 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 при збільшенні від 4000 до 12 000 разів.

Статистичний аналіз морфометричних показників 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 досліджень та їх обговорення.

Досліджуючи характер відновних процесів в яєчках алкоголізованих протягом 7 діб щурів та введення їм екстракту з листя Гінгго білоби на фоні стази крові у кровоносних капілярах, набряку їх стінки та стінки звивистих сім'яних каналців, 85% із них зберігають звичайну будову. Їх діаметр, в середньому, становить  $(247,15 \pm 1,8)$  мкм. У 10% каналців виявлено легкий ступінь пошкодження клітин сперматогенного епітелію, котрий проявляється злущенням частини клітин у просвіт та вакуолізацією цитоплазми, у 5% – важкий ступінь. За цих умов залишається незмінним об'єм ядер інтерстиційних ендокриноцитів  $(82,40 \pm 1,30)$  мкм<sup>3</sup>, але кількість сперматоцитів на стадії пахітени  $(264,46 \pm 2,59)$  та сперматид 7 етапу розвитку  $(853,61 \pm 3,57)$  є більшою, порівнюючи з тваринами без корекції сперматогенезу екстрактом з листя Гінгго білоби  $(243,09 \pm 2,35$  та  $820,32 \pm 3,21)$  відповідно.

В умовах затравки тварин етанолом та екстрактом з листя Гінгго білоби на протязі 14 діб набряк у стінці кровоносних судин та оболонці звивистих сім'яних каналців зберігається, але кількість звивистих сім'яних каналців, що зберегли звичайну будову, сягає 73,0% проти 67,0% без корекції сперматогенезу. В цих умовах кількість звивистих сім'яних каналців із легким та важким ступенем пошкодження клітин сперматогенного епітелію становить 27,0%

та 4 % проти 26, % і 6,0 % відповідно. На даний термін досліду у звивистих сім'яних канальцях зросла до  $247,15 \pm 3,00$  та  $805,15 \pm 5,20$  відповідно кількість сперматоцитів на стадії пахітени та сперматид 7 етапу розвитку проти  $216,24 \pm 6,47$  та  $790,57 \pm 11,61$  у тварин без корекції сперматогенезу, хоча наведені показники є значно нижчими, як у контрольній групі тварин ( $286,73 \pm 3,21$  та  $912,71 \pm 15,65$ ). Наближається до норми ( $80,33 \pm 1,42$ )  $\text{мкм}^3$  об'єм ядер інтерстиційних ендокриноцитів.

Із збільшенням терміну алкоголізації тварин та корекції сперматогенезу екстрактом із листя Гінґо білоби до 21 доби діаметр звивистих сім'яних канальців та об'єм ядер інтерстиційних ендокриноцитів становить ( $235,21 \pm 2,08$ )  $\text{мкм}$  та ( $79,02 \pm 1,35$ )  $\text{мкм}^3$  відповідно проти ( $221,17 \pm 4,3$ )  $\text{мкм}$  та ( $64,26 \pm 3,51$ )  $\text{мкм}^3$  у тварин без застосування екстракту із листя Гінґо білоби. На цей термін дослідів зросла у звивистих сім'яних канальцях кількість сперматоцитів на стадії прелептотени до  $228,31 \pm 2,70$ , сперматоцитів на стадії пахітени – до  $240,45 \pm 2,67$  і сперматид 7 етапу розвитку – до  $789,50 \pm 4,30$  відповідно. За даними електронної мікроскопії через 14 діб після алкоголізації тварин та введення їм екстракту з листя Гінґо білоби спостерігається значна вакуолізація цитоплазми ендотеліоцитів, що призводить до зниження її електронної щільності. Ядра клітин з інвагінаціями, мітохондрії з просвітленим матриксом та зменшеною кількістю мітохондріальних гребенів. Канальці ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі розширені. Базальна мембрана капілярів і власної оболонки звивистих сім'яних канальців потовщені. В ядрах міоїдних клітин хроматин розташований перинуклеарно, контури нуклеолеми нерівні, в цитоплазмі визначається редукція мікрофіламентів, розширення цистерн ендоплазматичної сітки та комплексу Гольджі, матрикс мітохондрій просвітлений, частина мітохондріальних гребенів редукована.

Ядра підтримувальних епітеліоцитів з просвітленою нуклеоплазмою, електронна щільність цитоплазми клітин знижена, матрикс мітохондрій вакуолізований, наявна часткова редукція їх гребенів, розширений просвіт канальців ендоплазматичної сітки та структур комплексу Гольджі. В частині звивистих сім'яних канальців виявлено деформацію структур з'єднувального апарату з редукцією мікрофіламентів та розширенням цистерн ендоплазматичної сітки. Такого ж характеру зміни мають місце в ядрі та цитоплазматичних органелах сперматогоній, сперматоцитів і сперматид.

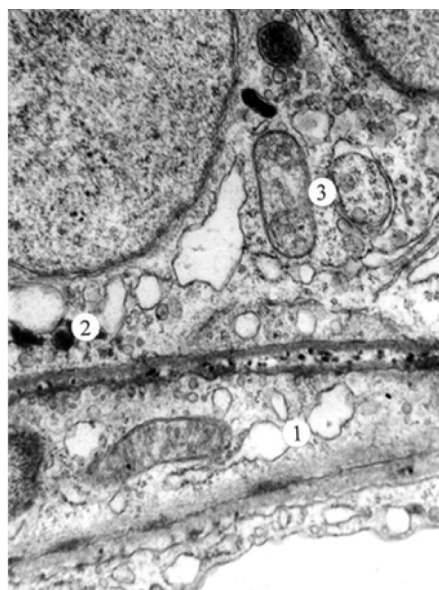
В інтерстиційних ендокриноцитах виявляється складчастість нуклеолеми, просвітлення цитоплазматичного матриксу, його вакуолізація, деформація мітохондріальних гребенів.

Отримані нами на 21 добу досліду дані свідчать про те, що ультраструктурні зміни в яєчку алкоголізованих тварин, котрим вводили екстракт з листя Гінґо білоби, виявились не такими значними (рис. 1) у порівнянні із групою алкоголізованих тварин без застосування екстракту.

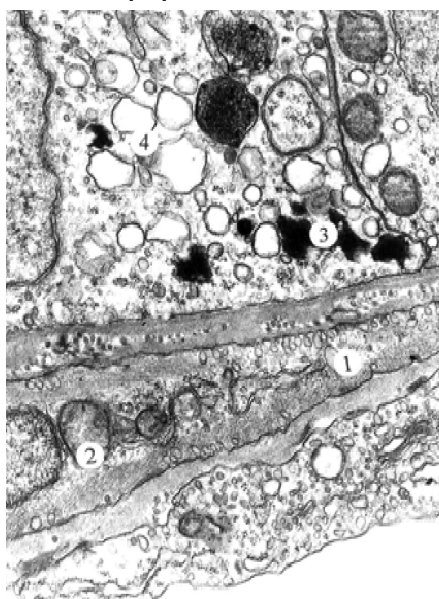
Зокрема, форма ядер ендотеліоцитів гемокапілярів переважно не змінена, хроматин в них розташований дифузно. Люмінальна цитолема утворює виступи різних розмірів. Цитоплазма ендотеліоцитів вакуолізована, канальці ендоплазматичної сітки та елементи комплексу Гольджі розширені, мітохондріальний матрикс – просвітлений.

Неклітинні шари власної оболонки звивистих сім'яних канальців нерівномірно розширені. Ядра міоїдних клітин веретеноподібної форми, з рівномірним розташуванням хроматину, цитоплазма клітин просвітлена, цитоплазматичні органели зберігають звичайну будову, міофіламенти частково редуковані.

В підтримувальних епітеліоцитах – просвітлення цитоплазми та мітохондріального матриксу, мітохондріальні гребені в частині із них редуковані, нерівномірно розширені канальці дегранульованої ендоплазматичної сітки та елементи комплексу Гольджі. Зміни в з'єднувальному апараті підтримувальних епітеліоцитів полягають



**Рис. 1.** Ультраструктурна будова власної оболонки звивистої сім'яного канальця та підтримувального епітеліоцита на 21 добу алкоголізації тварин. 1- значне розширення канальців дегранульованої ендоплазматичної сітки міоїдної клітини; 2- виражена вакуолізація цитоплазми підтримувального епітеліоцита; 3- гомогенізація гребенів мітохондрій. Електронна мікрофотографія.  $36. \times 6000$ .



**Рис. 2.** Стан ультраструктур власної оболонки звивистого сім'яного канальця, підтримувального епітеліоцита на 21 добу алкоголізації щура та введення екстракту з листя Гінґо білоби. 1- вогнещева редукція мікрофіламентів в цитоплазмі міоїдної клітини; 2- редукція гребенів мітохондрій; 3- накопичення в цитоплазмі підтримувального епітеліоцита крапель жиру; 4- вакуолізація цитоплазми підтримувального епітеліоцита. Електронна мікрофотографія.  $36. \times 6000$ .

в нерівномірному розширенні щілини між цитолемами і редуції мікрофіламентів. В частині сперматогоній, сперматоцитів та сперматид наявні деструктивні зміни у цитоплазматичних органелах, зокрема у мітохондріях і ендоплазматичній сітці. Подібного характеру ультраструктурні зміни мають місце в інтерстиційних ендокриноцитах.

Таким чином, отримані нами результати застосування екстракту з листя Гінкго білоби у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією показали позитивний ефект на розвиток компенсаторно-відновних процесів в яєчках [5], які проявились збільшенням кількості у звивистих сім'яних канальцях сперматоцитів на стадії прелептотени, пахитени та сперматид у порівнянні з такими ж даними у тварин, що не отримували коректора (**рис. 2**).

Привертає до себе увагу той факт, що у щурів, котрі отримували екстракт з листя Гінкго білоби об'єм ядер інтерстиційних ендокриноцитів наближається до контрольних цифр, що може

опосередковано свідчити про їх вищу ендокринну функцію [7]. Одержані нами дані свідчать про те, що застосування коректора в умовах етанолової інтоксикації сприяє нормалізації структурно-функціональної організації гематотестикулярного бар'єру та сперматогенезу.

### Висновки.

1. Застосування екстракту з листя Гінкго білоби в алкоголізованих тварин супроводжується достовірним збільшенням у звивистих сім'яних канальцях кількості статевих клітин на різних стадіях їх розвитку.

2. Екстракт з листя Гінкго білоби в умовах хронічної алкогольної інтоксикації сприятливо впливає на збереження структурних елементів гематотестикулярного бар'єру.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у визначенні коригуючого впливу на сперматогенез алкоголізованих щурів направленого кровотоку до яєчка артерією сім'явиносної протоки.

## Література

1. Бондаренко О. Вплив N-стероїлетаноламіну та хронічної алкоголізації на поведінку щурів у тесті «Відкрите поле» / О. Бондаренко, Н. Гула, М. Макачук // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2013. – В. 62. – С. 285-293.
2. Гладкова А. И. Андрологические проявления стресса / А. И. Гладкова. – Харьков, 2013. – 267 с.
3. Дереча Л. М. Состав фосфолипидов клеток крови, печени та головного мозга тварин при тривалій дії етанолу / Л. М. Дереча // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія, 2007. – Вип. 5, № 768. – С. 25-28.
4. Пастухова В. А. Вплив Гінкго білоби на ультраструктуру яєчок щурів при дії експериментальної гіпертермії / В. А. Пастухова // Галицький лікарський вісник. – 2010. – №2, Е. 17, частина 2. – С. 80-82.
5. Пархоменко Ю. М. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс вызванные длительным приемом алкоголя / Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко, С. Ю. Пилипчук // Укр. біохім. журнал. – 2007. – Т. 79, №3. – С. 62-68.
6. Степанец І. О. Отримання та характеристика імуноглобулінів класу G із сироватки крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією / О. І. Степанец // Медична хімія. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 72-75.
7. Meng J. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier / J. Meng, R. Holdcraft, J. Schima // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – № 102 (46). – P. 16696-16700.
8. Schill W. B. Andrology for the Clinician / W. B. Schill, F. N. Comhaire, T. B. Hargreave. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. – 800 s.
9. Siu M. K. Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis / M. K. Siu, C. Y. Cheng // Biol. Reprod. – 2004. – № 71 (2). – S. 375-391.

УДК 612.616:616.681:547.262.582.46

### МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЯЄЧОК В УМОВАХ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА КОРЕКЦІЇ ЕКСТРАКТОМ З ЛИСТЯ ГІНГГО БІЛОБИ

Долинко Н. П.

**Резюме.** Визначено вплив екстракту з листя Гінкго білоби на гістологічні та ультраструктурні зміни в яєчках алкоголізованих щурів. Отримані експериментальні дані свідчать про позитивний результат корекції сперматогенезу названим лікарським препаратом, котрий стимулює відновні процеси не тільки у звивистих сім'яних канальцях, але й в інтерстиційних ендокриноцитах та компонентах гематотестикулярного бар'єру. Незважаючи на позитивну динаміку досліджуваних показників повної нормалізації ультраструктур яєчок у названі терміни не спостерігається.

**Ключові слова:** алкогольна інтоксикація, відновні процеси, Гінкго білоба.

УДК 612.616:616.681:547.262.582.46

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЯИЧЕК В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И КОРРЕКЦИИ ЭКСТРАКТОМ С ЛИСТЬЕВ ГИНГГО БИЛОБА

Долинко Н. П.

**Резюме.** Определено влияние экстракта из листьев Гинкго билоба на гистологические и ультраструктурные изменения в яичках алкоголизованных крыс. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о положительном результате коррекции сперматогенеза названным лекарственным препаратом, который стимулирует восстановительные процессы не только в извитых семенных канальцах, но и в интерстициальных эндокриноцитах и компонентах гематотестикулярного барьера.



Несмотря на положительную динамику исследуемых показателей полной нормализации ультраструктур яичек в названные сроки не наблюдается.

**Ключевые слова:** алкогольная интоксикация, восстановительные процессы, Гинкго билоба.

UDC 612. 616:616. 681:547. 262. 582. 46

### **Morphofunctional State of Testes in Chronic Alcohol Intoxication and Correction with Ginkgo Biloba Leaf Extract**

**Dolynko N. P.**

**Abstract.** It has been investigated an influence of ginkgo biloba leaf extract on histological and ultrastructural changes in testes among drunken rats. These experimental findings show a positive effect of correction of spermatogenesis with drug mentioned above, which stimulates restorative processes not only in the convoluted seminiferous tubules but in the interstitial endocrinocytes and in the components of the blood-testes barrier. Despite the positive dynamics of indexes complete normalization of ultrastructure of the testes is not observed by a specified date.

Scientific research has been conducted according to the research plan of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University and is a part of research theme of the department of Human Anatomy and Physiology "Morphofunctional State of Blood Channels and Elements of Gonadal Tissue in the Human Male under the Influence of Pathogenic Factors" (registration number 0105U009082).

Infertility is a relevant problem and a significant social concern and in case of infertile couples the male factor is responsible for about 35% of cases. Among the ethiopathogenetic factors that induce male infertility and impotence alcohol intoxication plays an important role. In pathogenesis of alcohol-induced hypogonadism vascular condition is of great importance, and taking into account the vasoprotective properties of ginkgo biloba leaf extract in treatment of disorders of blood supply to organs and tissues the research goal was to discover corrective properties of plants on the spermatogenetic and endocrine function of the testes. The experiments have been conducted on 42 sexually mature male rats each about 150-180 grams in weight. Maintenance of rats and testing on them have been performed according to "The Ethical Principles and Guidelines for Experiments on Animals" approved by the National congress of bioethics (2001). Any offence against moral and ethical principles hasn't been detected by Commission on bioethics of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University while conducting scientific research (meeting minutes №1 held on Tuesday, 04 February 2014). The animals have been injected intragastrically with a 30% ethanol solution in the amount of 2 ml. per 100 gram body weight and with ginkgo biloba leaf extract in dosage of 0.5 ml. per 1 kilogram of body weight during the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day. Histological and submicroscopic changes in the testes have been examined at the same time. In histological examination of testicular tissue the diameter of the convoluted seminiferous tubules, the extent of seminiferous epithelium cells damage at the stage IV of the seminiferous epithelium cycle, nuclear volume of interstitial endocrinocytes have been discovered. Ultrastructural changes in the testis have been examined with a transmission electron microscope (125 kV TEM). Statistical analysis of morphometric measurements has been done using computer program STATISTICA for Windows®, pairwise comparison has been made with methods of nonparametric analysis using the Mann-Whitney U-test. The difference between indicators has been considered to be reliable when p was below 0. 05. On the 7<sup>th</sup> day of the experiment any expected changes in the structure of the testes haven't been detected. On the 14<sup>th</sup> day of the experiment 79.3% of the convoluted seminiferous tubules have had normal structure whilst among drunken rats 67.2% of the convoluted seminiferous tubules have developed some structural abnormality without using a corrector. The number of spermatocytes and spermatids in stage 7 has increased to  $251,20 \pm 3,18$  and  $858,06 \pm 3,74$  at the pachytene stage in comparison with  $201,24 \pm 6,47$  and  $790,57 \pm 11,61$  accordingly in the animals without any correction of spermatogenesis. However, indicators mentioned above were lower compared to indicators of a control group ( $286,73 \pm 3,21$  and  $912,71 \pm 15,65$  correspondingly). On the 21<sup>st</sup> day of the experiment the amount of spermatocytes in the convoluted seminiferous tubules at the pachytene stage has been  $240,45 \pm 2,67$  and the number of spermatids in stage 7 has counted  $789,50 \pm 4,30$  accordingly.

According to electron microscopy evidences in the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after the alcoholization and using ginkgo biloba leaf extract the vacuolization of endotheliocyte cytoplasm has been observed in the animal testis. Some invaginations have been identified in nuclei, mitochondria has had cleared intercellular matrix and a number of mitochondrial crests has been lower. The endoplasmic reticulum tubules and Golgi apparatus tubules have become widened. In nuclei of myoid cells perinuclear localization of chromatin has been found, contours of nucleolemma have been irregular, the reduction of microfilaments has been identified in cytoplasm, the ER cisternae and the Golgi apparatus cisternae have become widened, the mitochondrial matrix has been cleared, a number of the mitochondrial crests has reduced. The nuclei of supportive epithelial cells have been cleared, the cytoplasmic electron density has decreased, the mitochondrial matrix has been vacuolated, the mitochondrial crests have become partially reduced, and the ER lumen and the lumen of the Golgi apparatus have become widened.

The reduction of microfilaments and the widening of the ER cisternae have been identified in the connective apparatus. The nuclear membrane folding, clearing of the cytoplasmic matrix, its vacuolization, deformation of the mitochondrial crests have been found in the interstitial endocrinocytes.

**Keywords:** alcohol intoxication, recovery processes, Ginkgo biloba.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 24. 05. 2014 р.