

УДК 616.667-018-092.9:504

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ЕНДОКРИННОГО КОМПОНЕНТУ СІМ'ЯНИКІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Кривецький В. В.,²Москаленко Р. А.,
²Карпенко Л. І.,²Закорко І-М. С.*

*Буковинський державний медичний університет
Театральная пл., 2, 58002, Чернівці, Україна*

*²Сумський державний університет
вул. Римського-Корсакова, 2, 40007, Суми, Україна
(отримано 23.05.2013, надруковано 02.07.2013)*

У роботі розглядаються особливості морфологічного дослідження ендокринного апарату сім'яників щурів, шляхи виникнення і попередження артефактів при гістологічних дослідженнях. Грунтуючись на власних дослідженнях і даних наукової літератури, описано феномен гальмування сперматогенезу при активації клітин Лейдіга на фоні впливу несприятливих факторів. Активізацію ендокринного апарату сім'яників можна пояснити участю клітин Лейдіга в захисних компенсаторно-приспосувальних реакціях організму у відповідь на стрес.

Ключові слова: сім'яники, клітини Лейдіга, морфометрія, активація, стрес.

* eriugen@ukr.net

Проблема чоловічої неплідності з кожним роком набуває все більшого медичного і соціального значення у всьому світі, оскільки до 15% шлюбів є безплідними. Значна частка причин неплідності подружжя належить порушенням сперматогенезу (30-35%) [1]. Особливої актуальності проблема чоловічої неплідності набуває в Україні у зв'язку з процесами депопуляції населення впродовж останніх 20 років. Порушення сперматогенезу (секреторне безпліддя) часто обумовлене андрогенним дефіцитом, який виникає при ушкодженні апарату інтерстиційних ендокриноцитів яєчка. Ушкодження ендокринної частини чоловічих статевих залоз у значному ступені обумовлене несприятливим впливом навколишнього середовища, забрудненого продуктами техногенного походження [2]. Найбільш поширеною групою хімічних токсикантів є солі важких металів, які надходять в організм людини і тварин різними шляхами [2, 8, 9]. Екологічна патологія статевої системи чоловіків важко діагностується і тому завдає значної шкоди репродуктивному потенціалу нації [8].

Мета роботи: вивчити морфофункціональні особливості дослідження ендокринного апарату сім'яників щурів за умов впливу несприятливих чинників.

Матеріали і методи дослідження.

Морфометричні методи дослідження є одними з найбільш об'єктивних та інформативних методів оцінки функціонального стану сім'яників, так як дозволяють виявити навіть незначні коливання морфофункціональної активності.

Підготовка матеріалу до дослідження.

У порівнянні з іншими органами і тканинами, сім'яники є доволі складним об'єктом для гістологічного і гістохімічного дослідження, що підтверджується великою кількістю артефактів в отриманих мікропрепаратах. Дуже часто це зумовлено некоректними маніпуляціями з ніжною і складно організованою паренхімою органа. Отриманий експериментальний або аутопсійний матеріал необхідно зафіксувати до 6 годин (за деякими джерелами – до 10 год) [10], оскільки в багатій на гідролітичні ферменти залозистій тканині швидко починають розвиватися процеси аутолізу – дезорганізація пластів сперматогенного епітелію унеможливує кількісну оцінку інкреторної та генеративної функції сім'яників. Свіжий орган перед фіксацією необхідно зважити. Оскільки орган парний і лінійно-вагові показники мінливі і схильні до коливань в досить широких діапазонах, для стандартизації бажано брати або

правий або лівий сім'яник. У щурів співвідношення орган/тіло для сім'яників значно вище, ніж у людини. Маса сім'яників у щурів коливається від 25 мг до 5 г в залежності від вікової групи [3]. У репродуктивному віці маса і об'єм сім'яників може бути суттєво інформативною лише у разі різкої гіпертрофії або атрофії органа. Незважаючи на це, визначення об'єму сім'яника є обов'язковим етапом морфометричного дослідження. Визначення об'єму частіше проводять за методом витісненої рідини (сім'яник з неушкодженою білочною оболонкою занурюється у мірний циліндр). Також можливе визначення об'єму за формулою $V=1/2\pi \times r_1 \times r_2 \times r_3$, де r_1 , r_2 , r_3 – радіуси органа [14].

Фіксація тканини сім'яників найчастіше відбувається в 10% забуференому формаліні, рідше в рідині Боуїна, ценкер-формолі (модифікація Клівленда) [10]. При неправильній фіксації між каналцями сім'яника і інтерстицієм в гістологічних і електронномікроскопічних препаратах виникають щілини, які помилково можуть розцінюватися як прояви набряку, тощо (рис. 1). Попередити утворення щілин між каналцями сім'яника і строю можна за допомогою ін'єкцій фіксатора під білочну оболонку сім'яника в кількох місцях або перфузією через внутрішню сім'яну артерію розчинів суміші формальдегіду і глутаральдегіду [10].

Для отримання більш якісних препаратів зневоднення матеріалу у спиртах перед заливанням у парафін (пластинки сім'яника 0,3-0,4 см) повинно бути обережним і тривалим (не менше 24 год в кожній порції спирту). Раніше існувала думка, що заливка в целоїдин дає кращі результати [10], але цей спосіб виключає можливість імуногістохімічних досліджень, тому сьогодні целоїдинова провідка майже зникла в практичному використанні у більшості гістологічних лабораторій. Забарвлення зрізів (товщина 3-5 мкм) проводиться гематоксилін-еозином, гематоксиліном Майєра, толуїдиновим синім, за Ван Гізоном, Малорі, PAS – реакцією. PAS – реакція має значну інформаційну цінність, так як дозволяє ідентифікувати специфічні стадії розвитку сперматиди, сперматоцитів та сперматогонії [10].

Оцінка морфофункціональної активності інтерстиційних ендокриноцитів (клітин Лейдіга) включає в себе визначення їх

кількості, співвідношення їх різних морфофункціональних типів, розміру клітин і ядер.

Показником активності ендокриноцитів може служити відношення розмірів ділянки, яка зайнята клітинами Лейдіга, до площі зрізу у розрахунку на один поперечний зріз каналця. Кількість клітин Лейдіга підраховують при малому збільшенні мікроскопа у 20 випадкових полях зору.

Результати власних досліджень і їх обговорення.

Одним з критеріїв оцінки функціональної активності клітин Лейдіга є процентне співвідношення різних морфофункціональних типів ендокриноцитів, виділених згідно класифікації Ю.А.Медведева і А.С.Портного, яка ґрунтується на цитохімічних і морфометричних дослідженнях [6]. В залежності від розмірів клітин і морфологічних критеріїв напруженості секреторного процесу виділяють малі, середні і великі клітини Лейдіга. Малі клітини Лейдіга мають овальну або веретеноподібну форму з центрально розташованим ядром, яке має округлу форму (незрілі клітини) або у вигляді тутової ягоди (інволюціонуючі клітини). Середні клітини Лейдіга мають полігональну або грушеподібну форму з правильним округлим ядром з добре вираженим ядерцем, мають зернисту цитоплазму, ядро менш базофільне, ніж у малій клітині. Великі клітини Лейдіга мають велике шароподібне ядро, різко вакуолізовану цитоплазму. Доведено, що великі і середні клітини Лейдіга мають більш високу активність ферментів циклу Кребса і містять специфічний для стероїдогенезу фермент – 3- β -стероїдогеназу, яка відсутня у малих клітинах. Ґрунтуючись на такій класифікації, Макаров І. Ю. [6] запропонував коефіцієнт морфофункціональної активності клітин Лейдіга (Ka), який показує відношення функціонально активних клітин Лейдіга (великі і середні) до неактивних (малі та інволюціонуючі) і розраховується за формулою:

$$Ka=(B+C)/M,$$

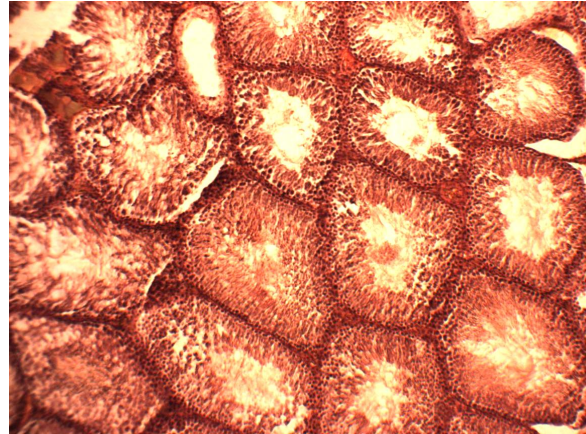
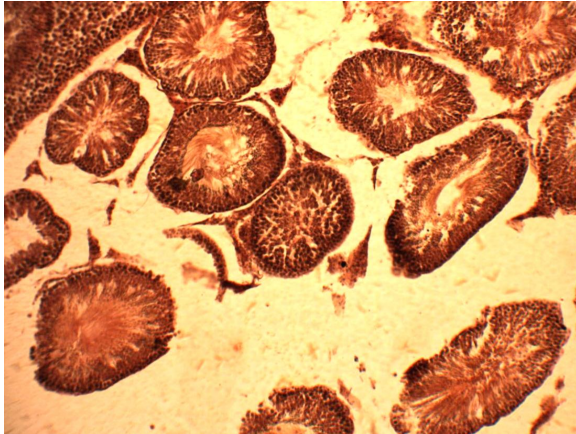
де В - процент великих клітин Лейдіга, С – процент середніх клітин Лейдіга, М – процент малих клітин Лейдіга.

Морфометричні показники, які характеризують функціональну активність інтерстиційних ендокриноцитів включають у

себе визначення розмірів і об'єму ядер. Об'єм ядер є важливим показником оцінки морфофункціонального стану клітин Лейдіга і, з рештою, ендокринної функції сім'яників. Для визначення цього показника необхідні більший і менший діаметри ядер гландулоцитів (морфометричні вимірювання проводяться при збільшенні $\times 400-900$ крат), за формулою $V_n=0,52 \times d_1 \times d_2$, де d_1 – менший діаметр ядра

клітини Лейдіга, d_2 – більший діаметр ядра клітини Лейдіга [6].

Аналіз наукової літератури показує неоднозначність поглядів на морфофункціональні зміни ендокринного апарату сім'яників в умовах впливу різноманітних несприятливих факторів різної інтенсивності. Більшість літературних джерел свідчать пригнічення ендокринного апарату сім'яників в умовах впливів [2, 4, 11, 13].



А.

Б.

Рисунок 1. Сім'яник статевозрілого щура. Заб. за Ван Гізоном. Зб.х360.

А. Артефакти при фіксації. Б. Збереження структури сім'яника.

У науковій літературі зустрічаються повідомлення про активізацію клітин Лейдіга на фоні пригнічення сперматогенезу в умовах впливу несприятливих факторів (двоокис марганцю, травми, гемікастрація) [4, 7, 9]. В умовах комбінованого впливу солей заліза, міді, цинку, хрому, марганцю та свинцю в субпорогових дозах у статевозрілих щурів відбувається збільшення об'єму ядра гландулоцитів, збільшення кількості функціонально активних клітин, що вказує на деяке компенсаторне підвищення їх ендокринної функції [7]. Найбільш виразне підвищення активності клітин Лейдіга відбувалося на 30 добу спостереження. На 48 добу параметри ядер гландулоцитів дещо зменшувалися, що може свідчити про їх функціональне виснаження.

У випадку травм, гемікастрації активацію гландулоцитів автори пояснюють компенсаторною реакцією на нестачу в організмі тестостерону [11] умовах впливу ксенобіотиків на сім'яні залози пояснити підвищення морфофункціональної активності гландулоцитів складніше. Скоріш за все ендокринні клітини сім'яників беруть участь у стресових реакція організму у відповідь на дію ксенобіотиків. При умові порушення процесів

стероїдогенезу екзогенними полотноантами в клітинах Лейдіга можлива також активація цих клітин за механізмом зворотнього негативного зв'язку через гіпоталамо-гіпофізарно-гонаду вісь: недостатність або дефектність тестостерону призводить до підвищення секреції лютеїнізуючого гормону (ЛГ) і проліферації гландулоцитів.

Висновки.

Морфологічні зміни клітин Лейдіга у значному ступені відображають їх функціональний стан. За умов впливу на сім'яники несприятливих чинників слабкої та помірної сили часто спостерігається феномен інтратубулярного гальмування дозрівання сперматогенного епітелію при активації клітин Лейдіга. Активацію ендокринного апарату сім'яників можна пояснити компенсаторно-приспосувальною реакцією організму в умовах стресу, яка підвищує опірність організму до несприятливого оточення.

Список опрацьованої літератури:

1. Авраменко Н. В. Аспекти репродуктивного здоров'я населення України /

Н. В. Авраменко, Д. Е. Барковский // Запорожский медицинский журнал. – 2010. – Т.12, №3. – С.71-73.

2. Артюхин А. А. Техногенные причины мужской infertility и их профилактика / А. А. Артюхин // Медицина труда и промышленная экология. – 2004. - №10 – С.42-43.

3. Лабораторные животные (Разведение, содержание, использование в эксперименте) / [Западнюк В. И., Западнюк И. П., Захария Е. А., Западнюк Б. В.]-К.: Вища школа, -1983.-383с.

4. Люлько О. В. Стан сперматогенної та гормональної функції яєчок у чоловіків з варикоцеле до і після оперативного втручання / О. В. Люлько, В. П. Стусь // Урологія. – 2002. - №4. – С.69-71.

5. Макаров, И. Ю. Морфофункциональное состояние сегментарных бронхов и эндокринного аппарата семенников при бронхиальной астме: дис. . канд. мед. наук / И. Ю. Макаров. Благовещенск, 1995. - 181 с.

6. Медведев Ю. Л. Морфология гормонопродуцирующих клеток яичка при дисгормональной гиперпластической простатопатии / Ю. Л. Медведев, А. С. Портной // Архив патологии. – 1969. Т.31, № 5. с. 65 — 71.

7. Сауляк С. В. Морфометричний аналіз перетворень структури сім'яників в умовах модельованого мікроелементозу / С. В. Сауляк, А. М. Романюк / Актуальні питання експериментальної та клінічної медицини : наук.-практ. конф. студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів. – Суми, 21–22 квіт. 2012 р. : матеріали конф. / відп. ред. В. Е. Маркевич,

Л. Н. Приступа. – С. 41: Сумськ. держ. ун-т, 2012.

8. Сперматогенна функція в умовах впливу солей важких металів і корекції препаратом «Тівортін» [Романюк А. М., Сауляк С. В., Москаленко Ю. В., Москаленко Р. А.]/ Лікарська справа. – 2012. - №1-2. - С.123-128.

9. Стусь В. П. Вплив двоокису марганцю на сім'яники / В. П. Стусь // Урологія. – 1998. - №2. – С.68-71.

10. Ухов Ю. И. Морфологические методы в оценке функционального состояния семенников / Ю. И. Ухов, А. Ф. Астраханцев // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. -1983. - №3. – С. 66-71.

11. Mendis-Handagama S. M. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis / S. M. Mendis-Handagama, H. B. Ariyaratne // Biology of Reproduction. – 2001. – Vol.65. – P.660–671.

12. Cheng J. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells / J. Cheng, J. Fu, Z. Zhou // Toxicology. – 2005. – Vol. 211(1-2). – P.1-11.

13. Chronic stress induces ageing-associated degeneration in rat Leydig cells / F. F. Wang, Q. Wang, Y. Chen [et al] // Asian J Androl. – 2012. – Vol. 14, No.4. – P.643-8.

14. Kothari L. K. Effect of Ageing on the Volume, Structure and Total Leydig Cell Content of the Human Testis / L. K. Kothari., A. S. Gupta // Int. J. Fertil. – 1974. – Vol. 19 – P. 40-3.

15. Wirth J. J., Mijal R.S. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function // Syst. Biol. Reprod. Med. – 2010. – Vol. 56, No. 2. – P. 147-67.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОКРИННОГО КОМПОНЕНТА СЕМЕННИКОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

Кривецький В. В., Москаленко Р. А., Карпенко Л. И., Загорко И-М. С.

Буковинский государственный медицинский университет

Театральная пл., 2, 58002, Черновцы, Украина

Сумский государственный университет

ул. Римського-Корсакова,2, 40007, Сумы, Украина

В работе рассматриваются особенности морфологического исследования эндокринного компонента семенников крыс, пути возникновения и предупреждение артефактов при гистологических исследованиях. Основываясь на результатах собственных исследований и данных научной литературы, описано феномен торможения сперматогенеза и активизации клеток Лейдига на фоне воздействия неблагоприятных факторов. Активизацию эндокринного аппарата семенников можно объяснить участием клеток Лейдига в защитных компенсаторно-приспособительных реакциях организма в ответ на стресс.

Ключевые слова: семенники, клетки Лейдига, морфометрия, активация, стресс.

**FEATURES OF MORPHOFUNCTIONAL STUDY OF TESTIS' ENDOCRINE COMPONENT IN
EXPERIMENTAL CONDITIONS**

Kryvetsky V. V., Moskalenko R. A., Karpenko L. I., Zakorko I.-M. S.

Bukovinian State Medical University

2, Theatralna Square, 58002, Chernivtsi, Ukraine

Sumy State University

2, Rumskogo-Korsakova St., 40007, Sumy, Ukraine

The features of morphological studies of endocrine testes' apparatus of rats, the ways of occurrence and prevention of artifacts in the histological studies are examined in this work. Based on our own research and data research literature the phenomenon of inhibition of spermatogenesis in the activation of Leydig cells on the background of adverse factors was described. The activation of the endocrine system can be explained by the participation of Leydig cells in the protective compensatory-adaptive reactions of the body in response to stress.

Keywords: testes, Leydig cells, morphometry, activation, stress.