

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *E. COLI* НА ТРЕТЬИ СУТКИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Поплавская Е. А., Лис Р. Е., Кравчук Р.И.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*Исследовалось влияние липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов на структурные изменения семенников крыс на 3-и сутки после воздействия. В процессе исследования установлено, что введение ЛПС *E. coli* самцам крыс вызывает развитие патологических изменений в семенниках животных опытных групп, которые выражаются в появлении отёка межканальцевой стромы и уменьшении в ней числа интерстициальных эндокриноцитов и размеров их ядер. А также приводит к изменению количества и морфологии клеток сперматогенного эпителия (суспендоцитов и сперматоцитов), что подтверждается и на электронно-микроскопическом уровне.*

Ключевые слова: липополисахариды, семенник, сперматогенез.

Введение

В настоящее время во многих странах мира, включая и нашу страну, наблюдается неблагоприятная демографическая ситуация. Анализ причин сложившейся ситуации показывает, что на формирование негативных процессов в демографии влияет сложный комплекс неблагоприятных факторов, в том числе и биологических – мужское и женское бесплодие, а также возрастание числа невынашиваний беременности [7, 8]. Частота невынашивания беременности колеблется от 10 до 25% всех клинически диагностированных беременностей. Около 80% выкидышей происходит до 12 недель беременности. Полагают, что в статистику не входит большое количество очень ранних и субклинически протекающих беременностей [1, 10].

В структуре невынашивания, особенно ранних потерь, одно из главных мест занимает неразвивающаяся беременность, частота которой в среднем составляет 18,9%. Ведущими причинами невынашивания беременности признаны генетические, эндокринные, иммунологические, а также инфекционные, составляющие 27%, возбудителями которых выступают как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы [3, 4].

Кроме жизнеспособных микробов эмбриотоксическое действие оказывают и их эндотоксины, представляющие собой липополисахариды. Известно, что бактериальные липополисахариды при воздействии на организм матери во время беременности вызывают нарушение дифференциации тканей внутренних органов и коры головного мозга у плодов, врожденные пороки развития, токсическое поражение внутренних органов, которые лежат в основе патологии постнатального онтогенеза [5]. При этом наблюдается прямой контакт их эндотоксинов с организмом матери. Все вышеприведённые факты ставят во главу угла в этиологии прерывания беременности или нарушений процессов антенатального развития только взаимоотношение организма матери и зародыша [2]. Согласно нашим исследованиям, прерывание беременности в доимплантационный период происходит и при воздействии липополисахаридов грамотрицательных бактерий на организм самцов перед спариванием с интактными самками. В данном случае прямое действие липополисахаридов на зародыш исключается, так как единственным посредником между организмом самки и самца является сперматозоид [6, 7]. Исходя из этого, можно предположить, что причиной репродуктивных потерь является нарушение сперматогенеза под воздействием

липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов, что приводит к гибели зародыша и, как следствие, прерыванию беременности на ранних сроках.

Сперматогенез – сложный многостадийный процесс роста, созревания и формирования сперматозоидов из незрелых половых клеток. Нормальное его протекание требует скоординированного влияния многочисленных факторов (генетических, клеточных, гормональных и других). Подобная сложность делает сперматогенез «легкой мишенью» для всякого рода негативных воздействий, в том числе и липополисахаридов.

В связи с вышеизложенным представляет несомненный интерес исследование влияния бактериальных ЛПС грамотрицательных бактерий на сперматогенез. Исходя из этого, в работе поставлена цель: изучить структурные изменения в семенниках крыс после воздействия бактериальных липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись половозрелые самцы беспородных белых крыс. Агентом воздействия выбраны бактериальные липополисахариды *Escherichia coli* серотип 0111:B4 производства фирмы «Sigma», США.

В эксперименте было использовано 78 самцов беспородных белых крыс. Масса самцов составляла 200 - 250 г. Все животные содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением требований, изложенных в Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными. Все этапы исследования проводились с разрешения комиссии по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Из самцов сформировали опытную и контрольную группы. Самцам опытной группы вводили ЛПС *E. coli* в дозе 50 мкг/кг массы внутривенно, однократно. Самцам контрольной группы вводился физиологический раствор в эквивалентном количестве. На 3-и сутки после воздействия самцов экспериментальных групп усыпляли парами эфира с последующей декапитацией. Животных вскрывали и выделяли семенники. Одну часть семенников фиксировали в жидкости Карнуа, готовили парафиновые срезы толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Вторую часть семенника фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия на 0.1 М буфере Миллонига, pH 7.4, при 40С в течение 2 часов, срезы заливали в аралдит, готовили полутонкие срезы (400 нм) и окрашивали метиленовым синим для

электронно-микроскопического исследования. На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических препаратах определяли диаметр перитубулярных гемокапилляров в межканальцевой строме, подсчитывали количество интерстициальных клеток в поле зрения и площадь их ядер, количество поддерживающих клеток в канальце и площадь их ядер и среднее количество первичных сперматоцитов. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 5 000-20 000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Иллюстративный материал получали с помощью цифровой фотокамеры Leica DFC 320 в комплексе с микроскопом Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

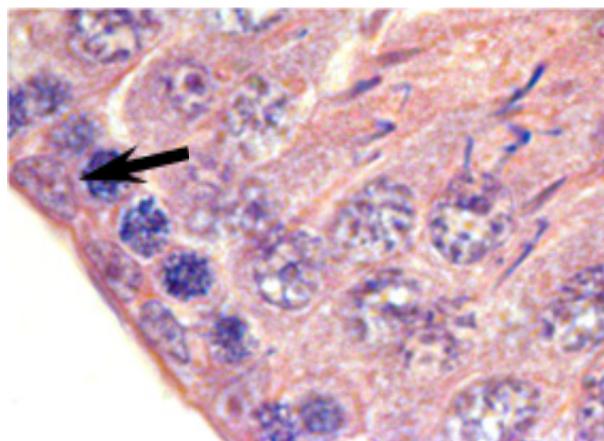
В семенниках опытных животных наблюдается отечность межканальцевой стромы, а в ней значительное уменьшение числа интерстициальных эндокриноцитов. Последние отличаются полиморфизмом, располагаются преимущественно группами, имеют отростчатую форму. Цитоплазма клеток зачастую вакуолизирована и отличается неравномерно распределенной и разной по тинкториальным свойствам зернистостью. Экспериментально установлено, что количество интерстициальных эндокриноцитов в межканальцевой строме статистически достоверно снижено по сравнению с контрольными животными на 13,85% ($Z=2,40$, $p=0,01$) (таблица 1). Площадь ядер, как показали данные морфометрии, уменьшена по сравнению с контрольными животными на 23,06% ($Z=1,96$, $p=0,04$) (таблица 1).

Таблица 1. – Количество интерстициальных эндокриноцитов, sustentocитов и размеры их ядер, сперматоцитов и диаметр гемокапилляров семенников крыс экспериментальных животных на 3 сутки после воздействия ЛПС *E. coli* (Me (Q1; Q2))

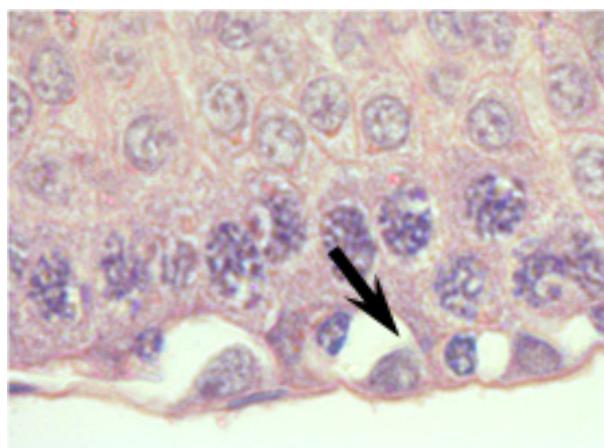
Исследуемые параметры	Контроль n = 6	Опыт n = 6
количество интерстициальных клеток	8,23 (8,07; 8,38)	7,09*↓ (6,48; 7,20)
площадь ядер интерстициальных клеток	23,76 (23,57; 24,65)	18,28*↓ (16,51; 19,41)
количество sustentocитов	22,33 (20,91; 23,21)	16,58 *↓ (15,02; 17,05)
площадь ядер sustentocитов	48,67 (46,22; 50,70)	40,32 *↓ (40,02; 41,03)
количество сперматоцитов	41,63 (40,74; 42,21)	30,58*↓ (29,02; 32,64)
диаметр гемокапилляров	10,76 (10,14; 11,71)	13,68*↑ (12,43; 14,86)

Примечания – * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем;
↑ – статистически значимое повышение изучаемого параметра

Sustentocиты в канальцах контрольных групп выделяются отчётливо. Основания клеток лежат на базальной мембране между сперматогониями, верхушки обращены к просвету канальца. В опытных группах на светооптическом уровне в



А



Б

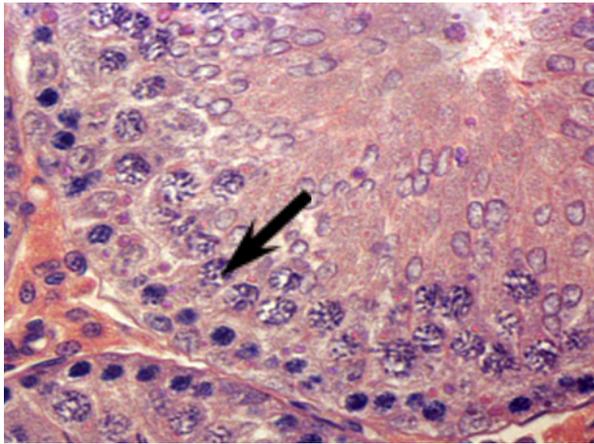
Рисунок 1. – Sustentocиты семенников крыс контрольной группы (А), и у крыс, на 3-и сутки после воздействия ЛПС *E. coli* (Б). Вакуолизация цитоплазмы клеток в опытной группе. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. об. 100

сустентоцитах наблюдаются выраженные морфологические изменения, заключающиеся в вакуолизации цитоплазмы клеток, в отдельных участках канальца наблюдается гибель клеток (рисунок 1).

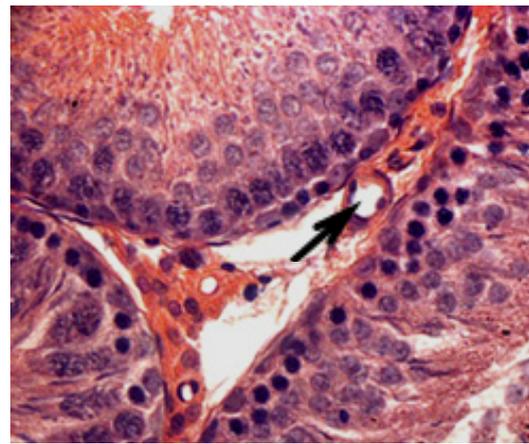
При сравнительном количественном анализе sustentocитов установлено снижение их количества и уменьшение площади их ядер на 3-и сутки после воздействия ЛПС *E. coli* по сравнению с контрольными показателями: количество клеток уменьшилось на 25,65% ($Z=2,61$, $p=0,006$), площадь их ядер – на 17,15% ($Z=2,12$, $p=0,03$) (таблица 1, рисунок 1).

Сперматоциты, располагающиеся в боковых выпячиваниях sustentocитов – крупные, округлой или овальной формы, несколько удалены от базальной мембраны извитого канальца, образуя несколько ярусов. В их ядрах хорошо выражен рисунок гетерохроматина (рисунок 2). Анализ количества сперматоцитов на срезе канальца показал, что у самцов, получавших ЛПС *E. coli*, на 3-и сутки после введения происходит снижение среднего количества клеток по сравнению с таковым у контрольных животных (таблица 1, рисунок 2) на 26,54% ($Z=2,40$, $p=0,01$).

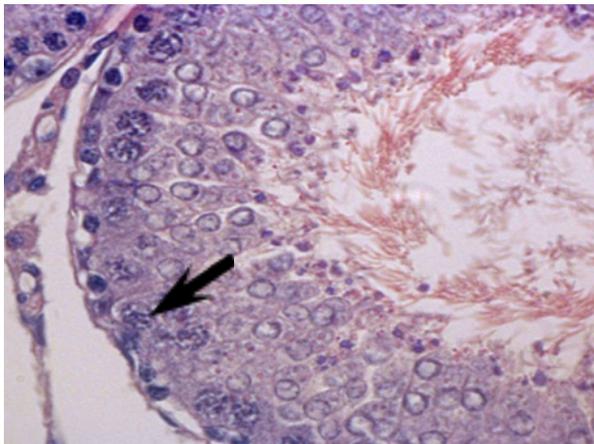
Перитубулярные гемокапилляры расширены, в некоторых наблюдается гемостаз (рисунок 3). Их диаметр увеличивается на 3-и сутки после воздействия ЛПС на 27,13% ($Z=-2,02$, $p=0,04$) (табл. 1, рис. 3).



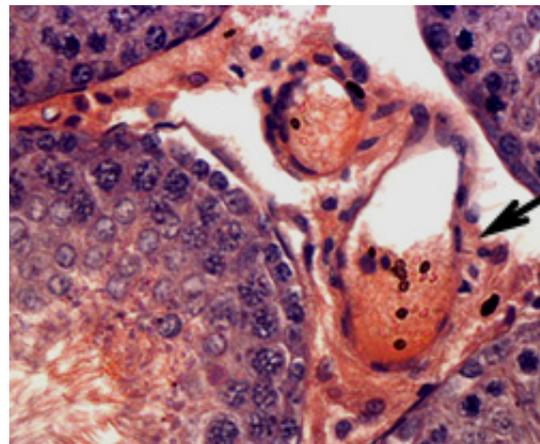
А



А



Б



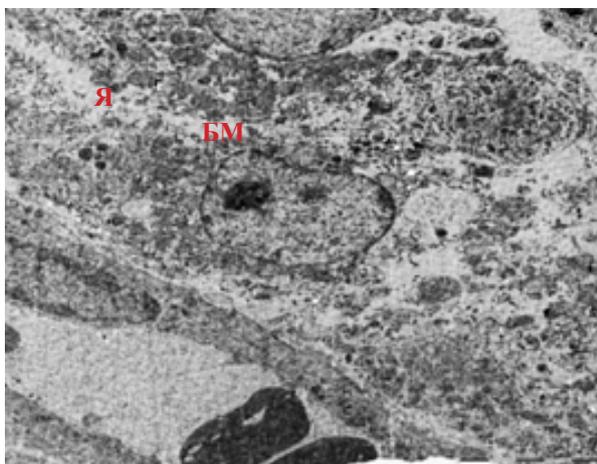
Б

Рисунок 2. – Сперматоциты в извитом канальце семенников у контрольных крыс (А) и у крыс, на 3-и сутки после однократного, внутрибрюшинного введения ЛПС *E. coli* (Б). Снижение количества сперматоцитов в канальце у крыс опытных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. об. 20

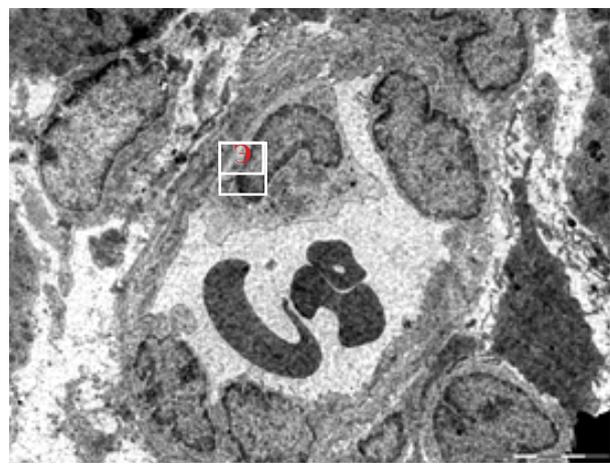
Рисунок 3. – Гемокапилляры в межканальцевой строме семенников крыс контрольной группы (А), и у крыс, на 3-и сутки после однократного, внутрибрюшинного введения ЛПС *E. coli* (Б). Расширение гемокапилляров. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. об. 40

Вышеуказанные изменения регистрировались и на электронно-микроскопическом уровне. В опытной

группе отмечается отечность межканальцевой стромы и расширение кровеносных капилляров (рисунок 4).



А



Б

Рисунок 4. – Кровеносный капилляр семенника контрольной группы (А) и на 3-и сутки после воздействия ЛПС *E. coli* (Б). Отёк межканальцевой стромы и расширение кровеносного капилляра. Базальная мембрана эндотелиоцита (БМ), ядро эндотелиоцита (Я), эритроциты в просвете капилляра (Э). Масштабный отрезок равен 5 мкм. Электронограмма. Ув. 6000

В интерстициальных эндокриноцитах выраженных патологических нарушений не наблюдается. Клетки располагаются группами или поодиночке, овальной формы, в цитоплазме присутствуют митохондрии с электронно-плотным матриксом. В ядрах выявляются от 1 до 3 ядрышек. При изучении оболочки извитого семенного канальца у опытных животных обращает на себя внимание отёчность базальной мембраны канальца (рисунок 5). Суспендоциты несколько удалены от базальной мембраны с единичными либо отсутствующими инвагинациями кариолеммы (рисунок 5,6). Хроматин мелкозернистый, равномерно распределенный в кариоплазме. Ядрышки с преобладанием гранулярного компонента, распределены неравномерно по кариоплазме ядра и смещены почти вплотную к ядерной оболочке либо отсутствуют (рисунок 6). В цитоплазме клеток в большом количестве обнаруживаются электронно-плотные довольно крупные скопления фаголизосом. Встречаются незначительные скопления митохондрий низкой электронной плотности, с разной степенью фрагментации и редукции крист и просветленным митохондриальным матриксом. Цитоплазма бедна органеллами. Первичные сперматоциты встречаются реже, чем в контроле. Имеют овальную форму. Ядра округлые, крупные. Хроматин мелкозернистый, равномерно распределен в кариоплазме. Цитоплазма клеток отличается слабой электронной плотностью с небольшим количеством органелл (рисунок 5,6). Митохондрии с единичными кристами и просветленным матриксом.

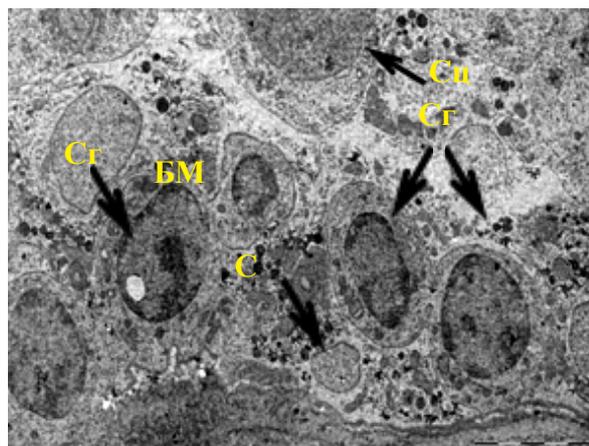
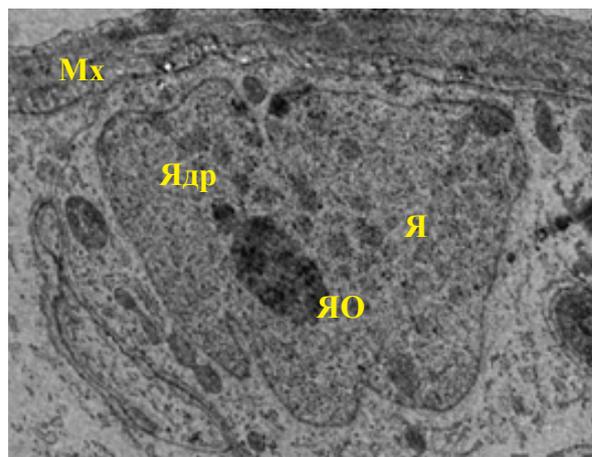


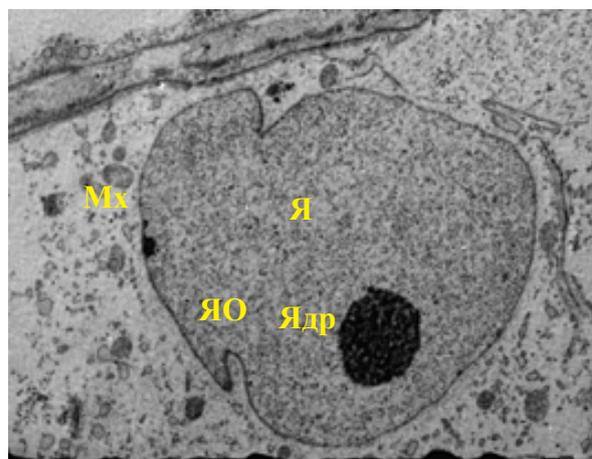
Рисунок 5. – Эпителио-сперматогенный слой семенника крысы на 3-и сутки после воздействия ЛПС *E. coli*. Крупно-глыбчатый хроматин в сперматогониях типа А извитого семенного канальца семенника. Базальная мембрана извитого канальца (БМ), сперматогония (С), суспендоцит (Сг), сперматоцит (Си). Масштабный отрезок равен 5 мкм. Электронограмма. Ув. 5000

Литература

1. Баев, О.Р. Социально-медицинские аспекты репродуктивной функции у первородящих старше 30 лет / О.Р. Баев, В.С. Белоусова // *Мать и дитя : материалы VI Российского форума*, Москва, 12-15 октября 2004 / под ред. В.И. Кулакова. – М., 2004. – С. 560.
2. Беломестнов, С.Р. Качество гамет и особенности гормонального статуса мужчин из супружеских пар с неблагоприятным течением беременности /



А



Б

Рисунок 6 – Суспендоциты извитого семенного канальца семенника контрольной крысы (А) и на 3-и сутки после воздействия ЛПС *E. coli* (Б)

Ядро (Я), ядрышко (Ядр), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх). Масштабный отрезок равен 1 мкм. Электронограмма. Ув. 10000

Вывод

Введение бактериального липополисахарида *E. coli* самцам крыс в дозе 50 мкг/кг массы внутрибрюшинно, однократно, на 3-и сутки после воздействия, вызывает развитие патологических изменений в семенниках животных опытных групп, которые выражаются в появлении отёка межканальцевой стромы и уменьшении в ней числа интерстициальных эндокриноцитов и размеров их ядер, а также приводит к изменению количества и морфологии клеток сперматогенного эпителия (суспендоцитов и сперматоцитов), что подтверждается и на электронно-микроскопическом уровне.

Literatura

1. Baev, O.R. Social'no-medicinskie aspekty' reproduktivnoj funkcii u pervorodyashhix starshe 30 let / O.R. Baev, V.S. Belousova // *Mat' i ditya : materialy' VI Rossijskogo foruma*, Moskva, 12-15 oktyabrya 2004 / pod red. V.I. Kulakova. – M., 2004. – S. 560.
2. Belomestnov, S.R. Kachestvo gamet i osobennosti gormonal'nogo statusa muzhchin iz supruzheskix par s neblagopriyatny'm techeniem beremennosti / S.R. Belomestnov, G.B. Mal'gina, V.I. Tokar' i dr. // *Materialy' 4 Rossijskogo*

С.Р. Беломестнов, Г.Б. Мальгина, В.И. Токарь и др. // Материалы 4 Российского форума «Мать и Дитя». М., 2004. С. 602-603.

3. Боб, Т.Д. Этиологические факторы неразвивающейся беременности / Т.Д. Боб // Бюл. мед. интернет-конф. – 2013. – Т. 3, № 3. – С. 660-661.

4. Доброхотова, Ю.Э. Неразвивающаяся беременность: аспекты этиологии. Возможности цитокиноотерапии в программе реабилитации в раннем послеабортном периоде / Ю.Э. Доброхотова, Г.Т. Сухих, Р.И. Озерова // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2006. – № 2. – С. 13-18.

5. Лис, Р.Е. Влияние бактериального липополисахарида продигозана на антенатальный нейрогенез коры больших полушарий плодов белых крыс / Р.Е. Лис, Ю.И. Бандажевский // Изв. АН БССР. Сер. биол. наук. – 1986. – № 4. – С. 76-79.

6. Лис Р.Е. Влияние бактериальных липополисахаридов *E. coli* и *S. marcescens*, введённых самцам крыс перед спариванием на развитие плодов / Р.Е. Лис, Е.А. Поплавская // Сборник статей «Актуальные проблемы медицины». – Гродно: ГрГМУ, 2010. – С. 17-21.

7. Поплавская, Е.А. Влияние бактериальных липополисахаридов *E. coli* и *S. marcescens*, введённых самцам крыс перед спариванием на показатели пре- и постимплантационной гибели и развитие плодов / Е.А. Поплавская, Р.Е. Лис // Новости медико-биологических наук. News of Biomedical Sciences. 2012. Т 6, № 4. - С.140-144.

8. Привалова, Н.И. Современные тенденции демографического развития Беларуси / Н.И. Привалова, Л.С. Станишевская // Наука и инновации. – 2014. – № 2 (132). – С. 9-16.

9. Руководство по охране репродуктивного здоровья / В.И. Кулаков [и др.] ; под общ. ред. В.И. Кулакова – М. : Триада-Х, 2001. – 568 с.

10. Сидельникова, В.М. Привычная потеря беременности / В.М. Сидельникова. – М. : Триада-Х, 2005. – 303 с.

foruma «Mat' i Ditya». М., 2004. С. 602-603.

3. Bob, T.D. E'tiologicheskie faktory' nerazvivayushhejsya beremennosti / T.D. Bob // Byul. med. internet-konf. – 2013. – Т. 3, № 3. – С. 660-661.

4. Dobroxotova, Yu.E'. Nerazvivayushhayasya beremennost': aspekty' e'tiologii. Vozmozhnosti citokinoterapii v programme reabilitatsii v rannem posleabortnom periode / Yu.E'. Dobroxotova, G.T. Suxix, R.I. Ozerova // Ros. vestn. akushera-ginekologa. – 2006. – № 2. – С. 13-18.

5. Lis, R.E. Vliyanie bakterial'nogo lipopolisaxarida prodigiozana na antenatal'ny'j nejrogenez kory' bol'shix polusharij plodov bely'x kry's / R.E. Lis, Yu.I. Bandazhevskij // Izv. AN BSSR. Ser. biol. nauk. – 1986. – № 4. – С. 76-79.

6. Lis R.E. Vliyanie bakterial'ny'x lipopolisaxaridov *E. coli* i *S. marcescens*, vvedyonny'x samcam kry's pered sparivaniem na razvitie plodov / R.E. Lis, E.A. Poplavskaya // Sbornik statej «Aktual'ny'e problemy' mediciny». – Grodno: GrGMU, 2010. – С. 17-21.

7. Poplavskaya, E.A. Vliyanie bakterial'ny'x lipopolisaxaridov *E. coli* i *S. marcescens*, vvedyonny'x samcam kry's pered sparivaniem na pokazateli pre- i postimplantacionnoj gibeli i razvitie plodov / E.A. Poplavskaya, R.E. Lis // Novosti mediko-biologicheskix nauk. News of Biomedical Sciences. 2012. Т 6, № 4. - С.140-144.

8. Privalova, N.I. Sovremenny'e tendencii demograficheskogo razvitiya Belarusi / N.I. Privalova, L.S. Stanishevskaya // Nauka i innovacii. – 2014. – № 2 (132). – С. 9-16.

9. Rukovodstvo po ohrane reproduktivnogo zdorov'ya / V.I. Kulakov [i dr.] ; pod obshh. red. V.I. Kulakova – М. : Triada-X, 2001. – 568 s.

10. Sidel'nikova, V.M. Privychnaya poterya beremennosti / V.M. Sidel'nikova. – М. : Triada-X, 2005. – 303 s.

STRUCTURAL CHANGES IN RAT TESTES EXPOSED TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE *E. COLI* ON THE 3RD DAY AFTER EXPOSURE

Poplavskaya E.A., Lis R.E., Kravchuk R.I.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

The aim of the study was to evaluate structural changes in the testes of rats on the third day after exposure to the bacterial lipopolysaccharide gram-negative microorganism Escherichia coli.

Bacterial lipopolysaccharide Escherichia coli (serotype 0111: B4, manufactured by Sigma, USA) was administered to male rats at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally one time. Research methods included histological, morphometrical, electron microscopy.

In the experimental animals there were detected a decrease in the number of interstitial endocrine cells by 13.85% and a decrease in the area of their nuclei by 23.06%; a decrease in the number of sustentocytes by 25.65% and reduction of the area of their nuclei by 17.15%; a decrease in the number of spermatocytes by 26.54%. Electron microscopic examination revealed swollen basement membrane of the tubules and ultrastructural changes in sustentocytes and spermatocytes.

Single administration of E. coli bacterial lipopolysaccharide to male rats at a dose of 50 mg/kg i.p., causes on the 3rd day after exposure development of pathological changes in the testes of the animals, which results in a reduction of interstitial endocrinocytes; reduction in the amount of sustentocytes and spermatocytes while reducing the size of their nuclei; changes in the ultrastructure of spermatogenic epithelium - in the form of large numbers of phagolysosomes in the cytoplasm of sustentocytes and reduction of cristae in mitochondria.

Key words: lipopolysaccharide, testis, spermatogenesis.

Адрес для корреспонденции: e-mail: Len.poplavska@mail.ru

Поступила 13.05.2015