

УДК 611.63+59.084:615.37
DOI 10.23648/UMBJ.2018.29.11368

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЕМЕННЫХ ПУЗЫРЬКОВ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

С.А. Кашенко, А.А. Захаров

ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки», г. Луганск,
Украина

e-mail: masterhist@mail.ru

По данным ВОЗ, около 25 % летальных случаев среди детей до 5 лет обусловлено неблагоприятными экологическими факторами. Риски, связанные с окружающей средой, такие как загрязнение воздуха внутри и вне помещений, вторичный табачный дым, вода, не соответствующая гигиеническим нормам, ежегодно уносят жизни 1,7 млн детей в возрасте до 5 лет. Взаимосвязь строения и функций иммунных органов с основными регуляторными системами организма приводит к тому, что иммуноактивные состояния занимают одну из ведущих позиций среди причин заболеваемости и смертности, особенно в детском возрасте. Мужская половая система является особо чувствительной к нарушениям иммунного статуса в связи с обилием активно делящихся клеток и присутствием им высоким уровнем метаболических процессов. Семенные пузырьки являются одними из важнейших мужских добавочных органов, которые формируют около 60 % семенной жидкости.

Целью исследования явилось изучение изменений морфометрических параметров семенных пузырьков белых крыс неполовозрелого возраста в условиях иммуносупрессии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 60 неполовозрелых белых крысах-самцах. Иммуносупрессивное состояние моделировали путем введения циклофосфамида внутримышечно в дозировке 1,5 мг/кг массы тела в течение 10 дней. Животных выводили из эксперимента через 1, 7, 15, 30 и 60 сут после прекращения введения препарата под эфирным наркозом. Определяли абсолютную массу органа, рассчитывали его относительную массу, измеряли длину, ширину и толщину, вычисляли объем органа. В семенных пузырьках изучали высоту эпителиоцитов, больший и меньший диаметры ядер клеток эпителия и их объем.

Результаты. Наиболее выраженные изменения морфометрических параметров установлены на ранних сроках наблюдения (1, 7 и 15-е сут), что может объясняться особой подверженностью семенных пузырьков иммуносупрессивному воздействию в результате возрастной структурно-функциональной незрелости и несовершенством регуляторных процессов на органном и системном уровнях.

Ключевые слова: семенные пузырьки, крысы, иммуносупрессия, циклофосфамид.

Введение. По данным ВОЗ, около 25 % летальных случаев среди детей до 5 лет обусловлено неблагоприятными экологическими факторами. Риски, связанные с окружающей средой, такие как загрязнение воздуха внутри и вне помещений, вторичный табачный дым, вода, не соответствующая гигиеническим нормам, ежегодно уносят жизни 1,7 млн детей в возрасте до 5 лет [1]. Доказано, что неблагоприятные факторы среды вызывают изменения состояния иммунной системы [2]. Взаимосвязь строения и функций иммунных

органов с основными регуляторными системами организма приводит к тому, что иммуноактивные состояния занимают одну из ведущих позиций среди причин заболеваемости и смертности, особенно в детском возрасте. Мужская половая система является особо чувствительной к нарушениям иммунного статуса в связи с обилием активно делящихся клеток и присутствием им высоким уровнем метаболических процессов.

Семенные пузырьки являются одними из важнейших мужских добавочных органов,

которые формируют около 60 % семенной жидкости. Их секрет богат фруктозой, белками, простагландинами, сложными углеводами и ферментами. Они также обеспечивают питательными веществами сперматозоиды и оптимизируют условия для их транспорта, подвижности и жизнеспособности [3].

В течение многолетнего изучения семенных пузырьков установлены определенные факты о строении, функции и патологических изменениях этих органов. Однако в последнее время исследовательский интерес к ним значительно увеличился. Это связано, с одной стороны, с более полным определением морфофункционального значения семенных пузырьков для мужской половой системы. С другой стороны, на фоне относительно редких сообщений о патологических изменениях органов в клинической практике, в доступной литературе практически отсутствуют данные о морфометрических изменениях семенных пузырьков, тем более в условиях иммуносупрессии. Применение иммуносупрессивной химиотерапии вызывает значительные преобразования мужской половой системы, и, в частности, алкилирующие агенты являются наиболее распространенным фактором, вызывающим бесплодие. Наряду с этим сведения о морфологических показателях органов в детском возрасте полностью отсутствуют в научных источниках.

Цель исследования. Изучение изменений морфометрических параметров семенных пузырьков белых крыс неполовозрелого возраста в условиях иммуносупрессии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 60 неполовозрелых белых беспородных крысах-самцах, полученных из вивария лабораторных животных ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки». При работе с животными руководствовались статьей 245 УК РФ «Жестокое обращение с животными», положениями брифинга Европейского научного общества «Использование животных в исследованиях», а также рекомендациями руководства ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments), подготовленного National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals In Research [4].

Иммуносупрессивное состояние моделировали путем введения циклофосфамида внутримышечно в дозировке 1,5 мг/кг массы тела в течение 10 дней [2, 5]. Контролем служили крысы, которым вводили эквивалентные объемы 0,9 % раствора натрия хлорида по той же схеме. Животных выводили из эксперимента через 1, 7, 15, 30 и 60 сут после прекращения введения препарата под эфирным наркозом [6]. Семенные пузырьки взвешивали на торсионных весах WT-1000, рассчитывали относительную массу органа, определяли линейные размеры с помощью штангенциркуля ШЦ-I: длину, ширину и толщину. По формуле объема эллипсоида рассчитывали объем органа:

$$V = \frac{\pi ABC}{6},$$

где А – длина, В – ширина и С – толщина семенных пузырьков [7].

В связи с тем что результаты морфометрии правого и левого семенных пузырьков достоверно не отличались в контрольных и экспериментальных группах животных, в статье будут приведены результаты исследования правого органа.

После фиксации семенные пузырьки подвергали стандартной гистологической проводке, полученные срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и фотографировали с помощью автоматизированного морфометрического комплекса, включавшего микроскоп Olympus CX-41 и цифровой фотоаппарат Olympus SP 500UZ. Морфометрические исследования объектов проводили путем загрузки полученных цифровых изображений в компьютерную программу АСКОН «Компас-3D12.0». В семенных пузырьках изучали высоту клеток эпителия, больший и меньший диаметры, объем ядер эпителиоцитов. Объем ядра рассчитывали по формуле объема вытянутого эллипсоида вращения:

$$V = \frac{\pi AB^2}{6},$$

где V – объем ядра, А – больший диаметр, В – меньший диаметр [8].

Полученные данные обрабатывали с использованием лицензионной программы StatSoft Statistica v6.0. Достоверность различий между показателями экспериментальных

и контрольных групп определяли с помощью критерия Стьюдента–Фишера ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Семенные пузырьки неполовозрелых животных представляют собой небольшие вытянутые, уплощенные в переднезаднем направлении, мешковидные образования, располагающиеся над предстательной железой. Их наружная поверхность гладкая. Железа покрыта соединительнотканной капсулой. Нормальная внутренняя поверхность семенных пузырьков представляет собой неразвитую систему железистой архитектуры, выстланную плоским

или кубическим эпителием, которая формирует немногочисленные складки слизистой оболочки. В двухрядном эпителии между эпителиоцитами наблюдается небольшое количество округлых базальных клеток.

Органометрические параметры семенных пузырьков неполовозрелых животных контрольной группы претерпевали закономерные изменения: абсолютная и относительная массы, линейные и объемные показатели органа увеличивались соответственно возрасту крыс (табл. 1).

Таблица 1

Динамика органометрических параметров семенных пузырьков неполовозрелых крыс контрольной группы

Параметр	Сроки наблюдения, сут				
	1-е	7-е	15-е	30-е	60-е
Абсолютная масса, мг	42,34±1,64	48,85±1,15	57,00±2,10	58,26±1,35	83,27±2,87
Относительная масса, мг/г	0,29±0,01	0,37±0,01	0,35±0,01	0,39±0,01	0,53±0,02
Длина, мм	5,75±0,12	6,26±0,14	6,87±0,12	8,94±0,25	12,20±0,54
Ширина, мм	2,50±0,09	2,80±0,03	3,15±0,15	3,75±0,21	5,08±0,21
Толщина, мм	1,85±0,09	2,16±0,09	2,18±0,10	2,60±0,16	2,60±0,15
Объем, мм ³	13,92±0,21	19,82±0,19	24,70±0,31	45,63±1,31	102,86±4,23

После применения циклофосфида общий план строения семенных пузырьков не изменился, однако были установлены отклонения морфометрических параметров органа. Так, достоверная динамика органометрических показателей была выявлена на ранних сроках наблюдения: абсолютная масса уменьшалась на 11,82, 12,32 и 17,84 % соответственно 1, 7 и 15-м сут после окончания введения препарата. Значения относительной массы претерпевали сходные изменения: уменьшение показателей составило 13,05, 13,61 и 13,96 % соответственно срокам наблюдения.

Линейные и объемные параметры семенных пузырьков после иммуносупрессии изменялись аналогично весовым параметрам. Достоверные отклонения были установлены на ранних сроках эксперимента (рис. 1–4).

Морфометрические параметры клеток эпителия семенных пузырьков неполовозрелых крыс контрольных групп претерпевали закономерную возрастную динамику (табл. 2).

После применения циклофосфида морфометрические показатели эпителия семенных пузырьков достоверно отличались от контрольных значений. Так, высота клеток уменьшалась на 10,24, 14,86 и 16,32 % соответственно 1, 7 и 15-м сут наблюдения (рис. 5).

Размеры ядер эпителиоцитов также претерпевали достоверные изменения по сравнению с данными контрольной группы животных. Так, больший диаметр ядра после применения иммуносупрессора достоверно уменьшался на 6,68, 7,67 и 9,44 %, меньший диаметр – на 7,74, 8,69 и 10,11 % на 1, 7 и 15-е сут наблюдения соответственно (рис. 6).

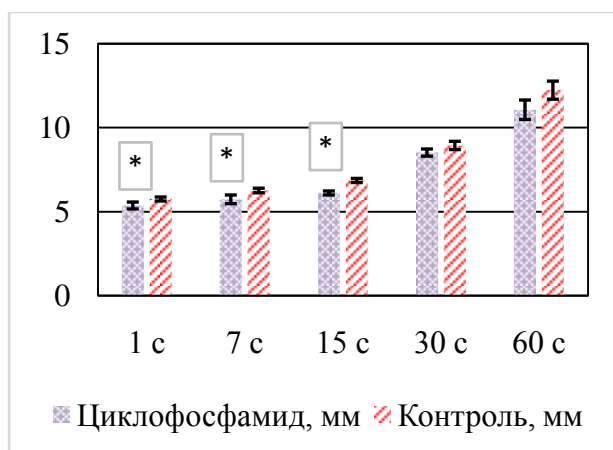


Рис. 1. Изменения длины семенных пузырьков после применения циклофосфамида и в контроле. Здесь и далее:

* – достоверное отличие от контрольных данных

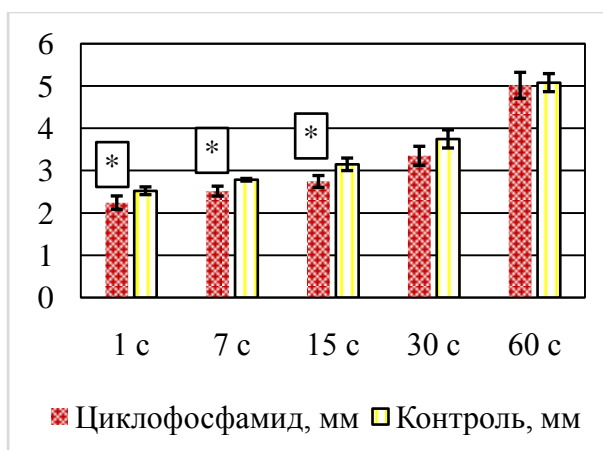


Рис. 2. Изменения ширины семенных пузырьков после применения циклофосфамида и в контроле

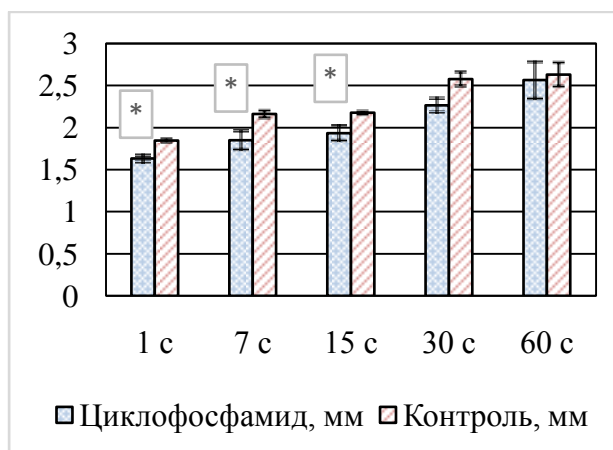


Рис. 3. Изменения толщины семенных пузырьков после применения циклофосфамида и в контроле

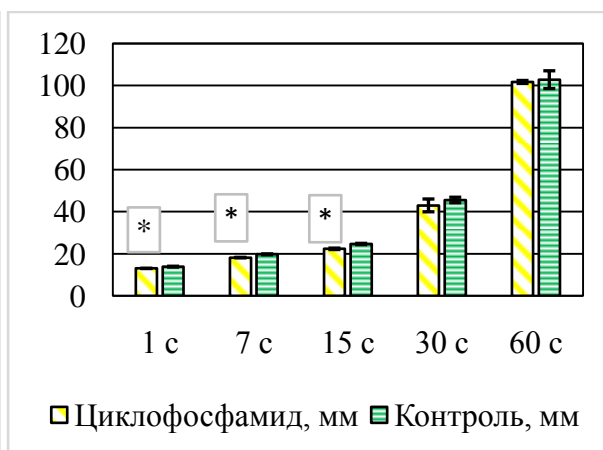


Рис. 4. Изменения объема семенных пузырьков после применения циклофосфамида и в контроле

Таблица 2

Динамика микроморфометрических параметров эпителиоцитов семенных пузырьков неполовозрелых крыс контрольной группы

Параметр	Сроки наблюдения, сут				
	1-е	7-е	15-е	30-е	60-е
Высота эпителия, мкм	8,82±0,40	9,20±0,61	9,50±0,69	9,80±1,65	10,10±1,64
Больший диаметр ядра, мкм	4,20±0,07	4,35±0,05	4,61±0,04	4,80±0,12	4,98±0,13
Меньший диаметр ядра, мкм	2,65±0,05	2,84±0,06	2,95±0,05	3,00±0,04	3,15±0,04
Объем ядра, мкм ³	15,44±0,19	18,37±0,24	21,01±0,27	22,62±0,30	25,87±0,29

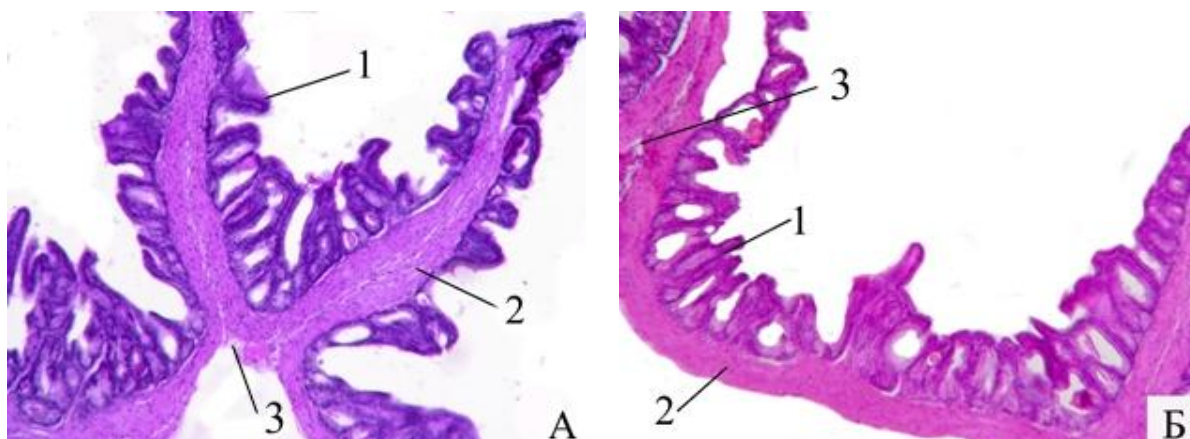


Рис. 5. Семенные пузырьки животных неполовозрелого возраста:
 А – через 7 сут после применения 0,9 % раствора NaCl;
 Б – через 7 сут после применения циклофосфамида;
 1 – слизистая оболочка, 2 – мышечная оболочка, 3 – адвентициальная оболочка.
 Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение: приближение: Zoom 18,5.
 Объектив: PlanCN 10^x/0.25 ∞/-/FN22



Рис. 6. Семенные пузырьки животных неполовозрелого возраста
 через 7 сут после применения циклофосфамида:
 1 – ядра эпителиоцитов, 2 – базальная клетка, 3 – мышечная оболочка.
 Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение: Zoom 18,5. Объектив: PlanCN40^x/0.65∞/0.17/FN22

Величина объема ядер эпителиальных клеток, косвенно свидетельствующая об их функциональной активности, также достоверно изменялась под влиянием иммуносупрессора. Снижение показателей отмечалось на ранних сроках наблюдения на 20,55, 22,79 и 26,75 % (1, 7, 15-е сут). Через 30 и 60 дней после завершения введения препарата статистически значимых отличий между данными

экспериментальной и контрольной групп по всем морфометрическим показателям ядер установлено не было, что может свидетельствовать о восстановлении структурно-функциональных параметров эпителия на поздних сроках эксперимента.

Полученные морфометрические данные могут указывать на снижение пролиферативной активности клеток эпителия семенных

пузырьков, что свидетельствует об угнетающем действии иммуносупрессивных доз циклофосфида на ранних сроках наблюдения. Динамика изменений линейных и объемных показателей изучаемого органа может быть вызвана «мягкой» схемой иммуносупрессии, в результате применения которой регенераторные процессы в эпителии на 30-е и 60-е сут эксперимента приводят к приближению исследуемых параметров к величине контрольных данных. Эти факты подтверждаются результатами исследования О.М. Кравчука, обнаружившего сходную ответную реакцию семенных пузырьков после гипертермии различной интенсивности [9], а также данными И.С. Волошиной, установившей уменьшение органомерических показателей органа после интоксикации парами толуола [10]. Также было выявлено, что после применения циклофосфида активизируются процессы аутофагоцитоза эпителии семенных пузырьков, что подтверждает полученные данные о возможном угнетении пролиферативной активности эпителиоцитов и, как следствие, его регенераторных возможностей [11].

С другой стороны, С.Х. Аль-Шукри и соавт. указывают на противоположные изменения морфометрических параметров семенных пузырьков при воспалительных процессах [12]. Разнонаправленная динамика показателей может объясняться угнетением функций иммунокомпетентных клеток после применения циклофосфида в рамках системной

иммуносупрессии, что вызывает торможение отечно-инфильтративных процессов в эпителии органа и, как следствие, уменьшение его линейно-весовых параметров.

Выводы:

1. Семенные пузырьки неполовозрелых животных после системной иммуносупрессии претерпевают ряд морфологических изменений, что указывает на активную реакцию органа на экзогенные воздействия.

2. Наиболее выраженные изменения органомерических параметров установлены на ранних сроках наблюдения (1, 7 и 15-е сут), что может объясняться особой подверженностью семенных пузырьков иммуносупрессивному воздействию в результате возрастной структурно-функциональной незрелости и несовершенством регуляторных процессов на органном и системном уровнях.

3. Изменения микроморфометрических показателей дополняют и подтверждают данные макроскопического исследования. Снижение высоты эпителиоцитов, а также линейных и объемных показателей их ядер может свидетельствовать о снижении функциональной активности клеток и, как следствие, замедлении регенераторных процессов в эпителии семенных пузырьков на ранних сроках эксперимента.

4. Полученные результаты побуждают к исследованию морфоструктуры органа после иммуносупрессии и иммуностимуляции в возрастном аспекте.

Литература

1. World Health Organization. Inheriting a Sustainable World: Atlas on Children's Health and the Environment. 2017. 139.
2. Ковешников В.Г., Фролов В.М., Кащенко С.А. Ультраструктура тимуса в условиях иммуностимуляции и иммуносупрессии. Украинский медицинский альманах. 2005; 3 (2): 36–40.
3. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., Чава С.В. Функциональная анатомия половых органов человека. Элиста; 2014. 88.
4. Vanda E. Use of Animals in Research. European Science Foundation Policy Briefing. 2000; 9: 1–6.
5. Лебединская Е.А., Лебединская О.В., Годовалов А.П., Ахматова Н.К., Мелехин С.В. Морфологические характеристики индуцированной иммуносупрессии. Новые задачи современной медицины: материалы Междунар. науч. конф. Пермь: Меркурий; 2012: 63–67.
6. Кащенко С.А., Бобрышева И.В. Особенности гистологического строения белой пульпы селезенки крыс в разные периоды постнатального онтогенеза в условиях экспериментальной иммуносупрессии. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2014; 1: 51–54.
7. Кравчук А.Н. Макроструктура семенных пузырьков половозрелых крыс. Украинский морфологический альманах. 2011; 9 (3): 114.

8. Киселев В.В., Федченко С.Н. Возрастные особенности биометрических характеристик надпочечников белых крыс под действием ксеногенной спинномозговой жидкости. Украинський морфологічний альманах. 2012; 10 (4): 48–50.
9. Кравчук О.М. Зміни морфометричних показників сім'яних міхурців після впливу помірної гіпертермії в експерименті. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2012; 11 (4): 7–9.
10. Волошина І.С. Вплив тіотриазоліну на морфометричні показники передміхурової залози та сім'яних пухирців статевонезрілих щурів після інгаляційної дії на організм толуолу. Украинський морфологічний альманах. 2012; 10 (1): 122–124.
11. Sastry M.S., Kashmiri Z.N. Autophagocytosis of seminal vesicle epithelium with Cyclophosphamide. International Journal of Current Science. 2013; 3: 128–133.
12. Аль-Шукри С.Х., Горбачев А.Г., Князькин И.В., Боровец С.Ю., Тюрин А.Г., Рыбалов М.А. Диагностическое значение секрета семенных пузырьков при хроническом простатите в эксперименте на мелких лабораторных животных. Урологические ведомости. 2013; III (2): 24–30.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF IMMATURE ANIMALS' SEMINAL VESICLES AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

S.A. Kashchenko, A.A. Zakharov

Saint Luke Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

e-mail: masterhist@mail.ru

According to WHO, about 25 % of deaths among children under 5 are determined by unfavorable environmental factors. Each year environmental risks, such as indoor and outdoor air pollution, passive smoking, and water that does not meet health criteria, kill 1.7 million children under the age of 5. The interrelation of the structure and functions of the immune organs with the basic bodily regulatory systems contribute to the fact that immunoactive states remain the main causes of morbidity and mortality, especially in children. The male reproductive system is particularly sensitive to immune status disorders due to the abundance of actively dividing cells and high inherent metabolic level. Seminal vesicles are one of the most important male supplementary organs, which form about 60 % of the seminal fluid.

The objective of the study was to examine changes in morphometric parameters of seminal vesicles of immature white rats under immunosuppression.

Materials and Methods. The study was conducted on 60 immature white male rats. The immunosuppressive state was simulated by administering cyclophosphamide intramuscularly (1.5 mg/kg body weight) for 10 days. The animals were withdrawn from the experiment in 1, 7, 15, 30 and 60 days after discontinuation of drug administration under ether anesthesia. The authors determined absolute organ mass, calculated its volume and relative mass, measured its length, width and thickness. In seminal vesicles the authors examined epithelial cell height, the larger and smaller diameters of epithelial cell nuclei and their volume.

Results. The most apparent changes in morphometric parameters were established at early observational stages (1st, 7th and 15th days). It can be explained by certain susceptibility of seminal vesicles to immunosuppressive effects as a result of age-related structural and functional immaturity and imperfection of regulatory processes at the organ and systemic levels.

Keywords: seminal vesicles, rats, immunosuppression, cyclophosphamide.

References

1. World Health Organization. *Inheriting a Sustainable World: Atlas on Children's Health and the Environment*. 2017. 139.
2. Koveshnikov V.G., Frolov V.M., Kashchenko S.A. Ul'trastruktura timusa v usloviyakh immunostimulyatsii i immunospressii [Thymus ultrastructure under immunostimulation and immunosuppression]. *Ukrains'kiy medichniy al'manakh*. 2005; 3 (2): 36–40 (in Russian).

3. Sapin M.R., Nikityuk D.B., Chava S.V. *Funktsional'naya anatomiya polovykh organov cheloveka* [Functional anatomy of human genital organs]. Elista; 2014. 88 (in Russian).
4. Banda E. Use of Animals in Research. *European Science Foundation Policy Briefing*. 2000; 9: 1–6.
5. Lebedinskaya E.A., Lebedinskaya O.V., Godovalov A.P., Akhmatova N.K., Melekhin S.V. Morfoloicheskie kharakteristiki indutsirovannoy immunosupressii [Morphological characteristics of induced immunosuppression]. *Novye zadachi sovremennoy meditsiny: materialy Mezhdunar. nauch. konf.* [New problems of modern medicine: Proceedings of the International scientific conference]. Perm': Merkurii; 2012: 63–67 (in Russian).
6. Kashchenko S.A., Bobrysheva I.V. Osobennosti gistologicheskogo stroeniya beloy pul'py selezenki krysa v raznye periody postnatal'nogo ontogeneza v usloviyakh eksperimental'noy immunosupressii [Peculiarities of white pulp histological structure in the spleen of rats at different periods of postnatal ontogenesis under experimental immunosuppression]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 1: 51–54 (in Russian).
7. Kravchuk A.N. Makrostruktura semennykh puzyr'kov polovozrelykh krysa [Macrostructure of seminal vesicles in mature rats.]. *Ukrains'kiy morfologichniy al'manakh*. 2011; 9 (3): 114 (in Russian).
8. Kiselev V.V., Fedchenko S.N. Vozrastnye osobennosti biometricheskikh kharakteristik nadpocheknikov belykh krysa pod deystviem ksenogennoy spinnomozgovoy zhidkosti [Age features of adrenal biometric characteristics of white rats following administration of xenogeneic cerebrospinal fluid.]. *Ukrains'kiy morfologichniy al'manakh*. 2012; 10 (4): 48–50 (in Russian).
9. Kravchuk O.M. Zmini morfometrichnikh pokaznikov sim'yanikh mikhurtsiv pislya vplivu pomirnoï gipertermii v eksperimenti. *Klinichna anatomiya ta operativna khirurgiya*. 2012; 11 (4): 7–9 (in Ukraine).
10. Voloshina I.S. Vpliv tiotriazolinu na morfometrichni pokazniki peredmikhurovoï zalozi ta sim'yanikh pukhirtsiv statevonezrilikh shchuriv pislya ingalyatsiynoi dii na organizm toluolu. *Ukrains'kiy morfologichniy al'manakh*. 2012; 10 (1): 122–124 (in Ukraine)
11. Sastry M.S., Kashmiri Z.N. Autophagocytosis of seminal vesicle epithelium with Cyclophosphamide. *International Journal of Current Science*. 2013; 3: 128–133.
12. Al'-Shukri S.Kh., Gorbachev A.G., Knyaz'kin I.V., Borovets S.Yu., Tyurin A.G., Rybalov M.A. Diagnosticheskoe znachenie sekreta semennykh puzyr'kov pri khronicheskom prostatite v eksperimente na melkikh laboratornykh zivotnykh [Diagnostic value of seminal vesicle secretion in an experiment on small laboratory animals with chronic prostatitis]. *Urologicheskie vedomosti*. 2013; III (2): 24–30 (in Russian).