

ОСОБЛИВОСТІ СТУПЕНЯ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ СПЕРМАТИД ЯЄЧКА ЩУРІВ ДРУГОГО ТА ТРЕТЬОГО МІСЯЦІВ ЖИТТЯ ПІСЛЯ ДІЇ ЖІНОЧИХ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ В ПРЕНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ

к. мед. н., старший викладач *Тополенко Т. А.*,
к. мед. н., старший викладач *Матвейшина Т. М.*

Україна, м. Запоріжжя, Запорізький державний медичний університет, кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії

ARTICLE INFO

Received 08 April 2018

Accepted 22 April 2018

Published 12 May 2018

KEYWORDS

testes,
rats,
spermatogenesis,
utrogestan

ABSTRACT

During the VI^a-IX^a stages, the most important stages of cytogenetization are sequentially taking place, which include the essential and irreversible transformation of such organelle cells as the cell center and the Golgi complex, which derivatives (tail section, acrosoma) provide in the future two main functions - sperm motility and the fertilization process. In addition, at the stage IX^a, intercellular interactions between Sertoli cells and spermatogenous cells are significantly altered - the previous generation of mature spermatozoa loses contact with Sertoli cells and moves to the lumen of the testicle canal. In this case, a more tight morphofunctional relationship between supporting cells and a new generation of differentiated spermatids is established. Evaluating the state of the cells of the spermatogenic series at stages VI^a-IX^a under conditions of influence on them of female sex hormones (the Utrogestan), it is possible to evaluate the cellular and intercellular mechanisms of violation of the spermatogenic processes in particular the spermatid differentiation process, especially taking into account the increased sensitivity of the final stages of spermatogenesis to the influence of exo- and endogenous factors.

© 2018 The Authors.

Вступ. На теперішній час проблема безпліддя стоїть досить гостро та залишається однією з найважливіших соціальних і медичних проблем [2]. Особливої уваги потребує вивчення причин зростання питомої ваги чоловічого фактору безпліддя за останні 25 років [6]. Однією із причин цього явища, разом з несприятливим впливом способу життя на чоловічу репродуктивну систему, вважають вплив хімічних факторів, що мають естрогенну активність та в подальшому можуть взаємодіяти з ендокринною та імунною системами чоловіків [9, 11]. Фактори, що впливають на організм матері та плода у період вагітності у подальшому можуть спричинити зміни гормонального балансу в материнському організмі й гальмування процесів сперматогенезу у потомства чоловічої статі [1, 7, 10]. Для вивчення впливу жіночих статевих гормонів на розвиток яєчок у плодів і новонароджених розроблено експериментальну модель [4]. Через те, що ці питання вивчено недостатньо, їх дослідження є доцільним та актуальним.

Мета. Визначити показник ступеня диференціювання сперматид у звивистих сім'яних трубках яєчок потомства щурів, які отримували утрожестан в другому або третьому періодах вагітності.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження стали яєчка 56 новонароджених білих лабораторних щурів на 60 і 90 добу постнатальної життя, отриманих від щурів з датованим терміном вагітності. В якості жіночих статевих гормонів використовували утрожестан, який вводили вагітним самкам вагінально в дозі 100 мг. Щурів розділили на групи в такий спосіб: перша – інтактні тварини; друга – контрольна, щурам інтравагінально вводили фізіологічний розчин хлориду натрію 0,9 %, третя – тваринам вводили утрожестан вагінально протягом другого (з 8 по 14 день), четверта група – утрожестан вводили протягом третього періоду вагітності (з 15 по 21 день). Вагітним самкам за допомогою спеціального пристрою для інтравагінального введення [3] з 8-ї по 14-у та з 15-ї по 21-у добу вводили натуральний препарат прогестерону – «Утрожестан», у дозі 100 мг, яка була розрахована за допомогою спеціальної формули у перерахунку на середню масу статевозрілої самки щура. Маніпуляції тривалістю 30 - 45 секунд проводились із дотриманням правил асептики й антисептики. Пологи протікали без особливостей. Новонароджені щури всіх груп народжувалися доношеними, на 21 - 22 добу після запліднення. Вибір утрожестану в якості жіночого статевих гормону пояснюється його широтою застосування в сучасній клінічній

практиці. При роботі з експериментальними тваринами керувалися «Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.86). Матеріал фіксували в рідині Буена, зневоднювали, заливали в парафін-віск-каучук (20:1:1) та виготовляли гістологічні зрізи. Препарати забарвлювали розчином альціанового синього (рН 2,6) з критичною концентрацією $MgCl_2$ 0,2M. Ядра дофарбовували гематоксином Ерліха. Для обчислення показника ступеня диференціювання сперматид (співвідношення середньої кількості сперматид в одиниці площі зрізу звивистих сім'яних каналців на VI^a та IX^a стадіях сперматогенезу за класифікацією С.Р. Leblond [8]) відбиралися препарати яєчка щурів на шестидесяту та дев'яносту добу післянатального періоду життя, тобто статевозрілих самців. На поперечних зрізах сім'яників досліджували по п'ять каналців на стадіях VI^a та IX^a сперматогенезу. Проводили виміри зовнішнього діаметру каналця та діаметру просвіту. Потім в стандартній площі поля зору, яке включає всю товщу сперматогенних клітин, підраховували кількість сперматид. Обчислення показника ступеня диференціювання сперматид здійснювали за спеціальною формулою [5]. Всі отримані числові результати дослідження оброблені за допомогою методів варіаційної статистики з використанням ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5).

Отримані результати та їх обговорення. На 60 та 90 добу післянатального життя представляється можливим визначення усіх стадій сперматогенезу у звивистих сім'яних трубочках яєчок щурів. У порожнині звивистих трубочок яєчка двомісячних та тримісячних щурів визначаються сперматогонії типу В, які знаходяться у стадії мітозу; сперматоцити I порядку - у стадії пахінеми; у сперматидах починається формування акросомальної шапочки; у сперматозоїдах ядро має серповидну форму, цитоплазма зміщена вздовж хвостової частини, яка формується. всі описані характеристики свідчать про VI^a стадію сперматогенезу за класифікацією Leblond et al. з доповненнями Perey et al. Якщо в порожнині трубочок спостерігали мітотичний поділ сперматогоній типу А; сперматоцити I порядку знаходились у стадії пахінеми; у сперматидах ядро було вже зі сформованою акросомальною шапочкою, яка знаходилася асиметрично, й адлюмінальний поверх сім'яної трубочки був вільним від сперматозоїдів та залишкових тілець, то такий стан сім'яної трубочки визначали як IX^a стадію сперматогенезу за тією ж класифікацією.

При проведенні порівняльної оцінки стану сперматогенезу статевозрілих щурів за допомогою заявленого способу, отримані наступні результати: у інтактній та контрольній групах щурів другого місяця життя показник ступеня диференціювання сперматид становить $0,92 \pm 0,09$ та $0,94 \pm 0,03$ відповідно У потомства щурів після введення утрожестану протягом другого періоду вагітності він є більш низьким – $0,89 \pm 0,03$, а у потомства щурів, які отримували утрожестан у третьому періоді вагітності – найбільш низьким серед усіх досліджуваних тварин цього строку спостереження – $0,86 \pm 0,0$.

На дев'яносту добу післянатального періоду онтогенезу у інтактних та контрольних тварин показник ступеня диференціювання сперматид близький до 1,0 і становить $0,98 \pm 0,02$ та $0,97 \pm 0,03$ відповідно.

У експериментальних тварин обох досліджуваних груп показник ступеня диференціювання сперматид є меншим порівняно із показниками контролю ($0,91 \pm 0,01$ та $0,89 \pm 0,02$ відповідно в другій та третій експериментальних групах проти $0,97 \pm 0,27$ у контролі) (див. мал. 2). Одночасно у порівнянні з шестидесятою добою життя показник ступеня диференціювання сперматид збільшується для усіх груп досліджуваних тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Динаміка показника ступеня диференціювання сперматид яєчка щурів другого та третього місяців життя

№ п/п	Група тварин	Вік тварин (доба життя)	
		60	90
1	інтактна	$0,92 \pm 0,08$	$0,98 \pm 0,02$
2	контрольна	$0,94 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,03$
3	3 експериментальна	$0,89 \pm 0,03^*$	$0,91 \pm 0,01^*$
4	4 експериментальна	$0,86 \pm 0,02^*$	$0,89 \pm 0,02^*$

Примітки:

1. Групи тварин: 3 експериментальна - тварини, які отримували утрожестан у другому періоді вагітності, 4 експериментальна - тварини, які отримували утрожестан у третьому періоді вагітності;

2.* - символ означає при порівнянні у контрольній та експериментальній групах при $p \leq 0,05$.

Отримані результати свідчать про затримку процесу диференціювання сперматид при застосуванні жіночих статевих гормонів протягом вагітності, особливо протягом третього її періоду, та порушення процесів спермато- та сперміогенезу в подальшому.

Таким чином, протягом VI^a - IX^a стадій послідовно відбуваються найважливіші етапи цитодиференціювання, які включають істотну та незворотню трансформацію таких органел клітини як клітинний центр та комплекс Гольджі, похідні яких (хвостовий відділ, акросома) забезпечують у подальшому дві найважливіші функції – рухомість сперматозоїдів і процес запліднення. Окрім того, на стадії IX^a істотно змінюються міжклітинні взаємодії між клітинами Сертолі та сперматогенними клітинами – попередня генерація зрілих сперматозоїдів втрачає зв'язок з клітинами Сертолі та переміщується в просвіт каналця яєчка. При цьому встановлюються більш тісні морфофункціональні взаємовідносини між підтримуючими клітинами та новою генерацією сперматид, що диференціюються. Тобто, оцінюючи стан клітин сперматогенного ряду на стадіях VI^a – IX^a в умовах впливу на них жіночих статевих гормонів (утрожестану), представляється можливим оцінювати клітинні та міжклітинні механізми порушення процесів сперматогенезу, зокрема процесу диференціювання сперматид, особливо враховуючи підвищену чутливість завершальних етапів сперматогенезу до впливу екзо- та ендогенних факторів.

Висновки.

1. На 60-ту добу життя у потомства щурів, які отримували утрожестан в другому та третьому періодах вагітності спостерігається статистично достовірне зменшення показника ступеня диференціювання сперматид яєчка ($0,89 \pm 0,03$ та $0,86 \pm 0,02$) при порівнянні з контрольною групою тварин ($0,94 \pm 0,03$).

2. На 90-ту добу життя у потомства щурів третьої та четвертої експериментальної груп у порівнянні з контрольною встановлено значно виражене зменшення показника ступеня диференціювання сперматид яєчка ($0,86 \pm 0,02$ та $0,89 \pm 0,02$ проти $0,97 \pm 0,03$), що свідчить про затримку процесу диференціювання сперматид, яка може призвести до порушення процесів спермато- та сперміогенезу в подальшому.

ЛІТЕРАТУРА

1. Запривода Л. П. Сравнительная характеристика морфологических методов оценки гонадотоксического эффекта химических веществ / Л. П. Запривода // Вісн. морфології. – 2001. – № 1. – С. 53–56.
2. Пастухова В. А. Морфологічне дослідження сперматогенезу у статевозрілих щурів / В. А. Пастухова // Морфологія. – 2011. – Вип. 3, т. 2 (88). – С. 145–146.
3. Пат. № 66583 Україна. МПК (2011.01). А61М 5/00. Інжектор для інтравагінального введення розчинів препаратів самкам щурів / Т. А. Тополенко, А. О. Алферов; заявник і патентовласник ЗДМУ і автори. – № у 2011 07501; заявл. 14.06.11; опубл. 10.01.12, Бюл. № 1.
4. Тополенко Т.А. Спосіб вивчення впливу утрожестану на формування чоловічих статевих органів та тимусу до і після народження / Т.А. Тополенко, В.М. Ямса // Український морфологічний альманах. – 2008. – Т. 6. №1. – С. 188.
5. Яценко В. П. Новый метод морфометрического исследования закономерностей сперматогенеза / В. П. Яценко, И. Г. Анисимова, Л. П. Запривода // Вісник морфології. – 1999. – № 2. – С. 224–226
6. Development of l-CDB-4022 as a nonsteroidal male oral contraceptive: induction and recovery from severe oligospermia in the adult male cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) / S. A. Hild, G. R. Marshall, B. J. Attardi [et al.] // Endocrinology. – 2007. – Vol. 148. – P. 1784–1796.
7. Kumar T. R. The «Glow» rats Sertoli and Germ Cells: mouse testis development and visualized in multi-colors / T. R. Kumar // Biology of reproduction. – 2011. – Vol. 84. – P. 201–204.
8. Mather Y. P. Activin stimulates spermatogonial proliferation in Germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis / Y. P. Mather, K. M. Attie, T. K. Woodruff // Endocrinology. – 1990. – Vol. 127. – P. 3206–3214.
9. Pan L. Exposure of juvenile rats to the progesterone daidzein impaire erectile function in a dose-related manner in adulthood / L. Pan, X. Xia, Y. Feng // J. Androl. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 55–62.
10. Yoko S. Glycoconjugats recognized by peanut Agglutinin lectin in the inner acellular layer of the lamina propria of seminiferous tubules in human testes showing impaired spermatogenesis / S. Yoko, N. Spiari, Y. Miki // Human Reproduction. – 2012. – Vol. 27 (2). – P. 143–148.
11. Chlorelis E. Estrogen receptor beta agonists in neurobehavioral investigations / E. Chlorelis, A. E. Clipperton, A. Phan // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2008. – Vol. 208, № 7. – P. 760–773.