

С. А. КАЩЕНКО, А. А. ЗАХАРОВ

## ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОСТРУКТУРЫ СЕМЕННИКОВ ЖИВОТНЫХ ПЕРИОДА ВЫРАЖЕННЫХ СТАРЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ИММУНОСУПРЕССИИ

ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки»,  
кв. 50-летия Оборона Луганска, 1г, Луганск, 91045.

### АННОТАЦИЯ

**Целью** исследования явилось изучение особенностей морфоструктуры семенников экспериментальных животных периода выраженных старческих изменений при искусственной супрессии иммунной системы.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на 60 белых крысах периода выраженных старческих изменений. Иммуносупрессию моделировали путем применения циклофосфамида в дозировке 1,5 мг/кг массы тела внутримышечно в течение 10 дней. Крыс выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после прекращения введения препарата. Органы взвешивали, рассчитывали относительную массу, определяли линейные размеры, по формуле объема эллипсоида рассчитывали объем органа. Измерялись больший и меньший диаметры, площадь извитого семенного канальца, высота и площадь эпителиосперматогенного слоя, рассчитывался индекс сперматогенеза, определялось количество sustentocytov и интерстициальных эндокриноцитов, а также объем их ядер.

**Результаты.** Статистически значимые различия полученных данных были установлены на 15-е и 30-е сутки наблюдения, тогда как на 1-е, 7-е и 60-е сутки достоверных отличий выявлено не было.

**Заключение.** В ответ на длительную иммуносупрессию отмечается активная реакция со стороны семенников животных периода выраженных старческих изменений. Статистически значимые различия органомерических показателей обусловлены прямым цитотоксическим действием циклофосфамида на быстро делящиеся клетки органа и системным гормональным дисбалансом. Данные микроморфометрического исследования, а также цито- и карิโอмерии позволяют подтвердить результаты органомерии и объясняются дисрегуляцией локального иммунного и эндокринного гомеостаза семенников после длительной иммуносупрессии.

**Ключевые слова:** циклофосфамид, семенники, иммуносупрессия, крысы

**Для цитирования:** Кащенко С.А., Захаров А.А. Изменения морфоструктуры семенников животных периода выраженных старческих изменений при иммуносупрессии. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018; 25(2): 88-93. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-2-88-93

**For citation:** Kashchenko S.A., Zakharov A.A. Changes in the morphostructure of animals' testes of the period of pronounced senile changes at immunosuppression. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2018; 25(2): 88-93. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-2-88-93.

S. A. KASHCHENKO, A. A. ZAKHAROV

CHANGES IN THE MORPHOSTRUCTURE OF ANIMALS' TESTES OF THE PERIOD OF PRONOUNCED SENILE CHANGES AT IMMUNOSUPPRESSION

SI LPR "St. Luke Luhansk State Medical University", 50-years of Luhansk Defense bl., 1g, Luhansk, 91045.

### ABSTRACT

**Aim.** The aim was to study the morphological characteristics of the testes of experimental animals during the period of pronounced senile changes at artificial suppression of the immune system.

**Materials and methods.** The study was carried out on 60 white rats with pronounced senile changes. Immunosuppression was modeled by cyclophosphamide at a dosage of 1.5 mg/kg body weight intramuscularly for 10 days. The rats were taken out from the experiment under ether anesthesia at 1, 7, 15, 30 and 60 days after discontinuation of the drug administration. The organs were weighed, the relative mass was calculated, the linear dimensions were determined, the volume of the organ was calculated from the volume formula of the ellipsoid. The larger and smaller diameters, the area of the convoluted seminiferous tubule, the height and the area of the epitheliospermatogenous layer were measured, the spermatogenesis index was calculated, the amount of the sustentocytes and interstitial endocrinocytes, and the volume of their nuclei were determined.

**Results.** Statistically significant differences in the data were established on the 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days of the observation, whereas on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days there were no significant differences. The conclusion. In response to long-term

immunosuppression, there is an active reaction from the testes of the animals during the period of pronounced senile changes. Statistically significant differences in the organometric parameters are due to the direct cytotoxic effect of cyclophosphamide on rapidly dividing organ cells and systemic hormonal imbalance. The data of micromorphometric examination, as well as cytometry and kariometry, confirm the results of organometry and are explained by the dysregulation of local immune and endocrine homeostasis of testes after prolonged immunosuppression.

**Keywords:** cyclophosphamide, testes, immunosuppression, rats

### Введение

По данным ВОЗ, во всех странах мира за последние десятилетия значительно увеличилась средняя продолжительность жизни, что закономерно приводит к росту количества населения пожилого и старческого возраста, и в ближайшем будущем эта тенденция только усилится [1]. В сочетании с наблюдаемым практически во всех государствах заметным снижением уровня фертильности такой процесс оказывает не менее значительное воздействие на структуру населения. В то же время, прогрессирующая урбанизация, концентрация населения в крупных промышленных центрах, что особенно актуально для Донбасса, стремительное развитие фармацевтической отрасли подвергают здоровье человека воздействию целого ряда неблагоприятных физико-химических и биологических воздействий. Исследования последних лет доказали, что в первую очередь и наиболее активно на изменения окружающей среды реагируют регуляторные системы, что, в свою очередь, вызывает комплексный ответ организма [2]. Зачастую изменения структурно-функциональных взаимодействий иммунных и эндокринных органов после экзогенных воздействий сопровождаются системной иммуносупрессией [3, 4]. В доступной литературе встречается незначительное количество публикаций, касающихся вопросов морфологических изменений органов мужской половой системы в условиях длительной иммунодепрессии, особенно в пожилом и старческом возрасте.

**Цель исследования:** изучить особенности морфоструктуры семенников экспериментальных животных периода выраженных старческих изменений при искусственной супрессии иммунной системы.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на 60 белых крысах периода выраженных старческих изменений, полученных из вивария лабораторных животных ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки». Иммуносупрессию моделировали путем применения циклофосфамида в дозировке 1,5 мг/кг массы тела внутримышечно в течение 10 дней. Животные, получавшие аналогичные объемы 0,9% раствора NaCl по той же схеме, входили в контрольную группу. Крыс выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после прекращения введения препарата. При работе с животными руководствовались Директивой 2010/63/EU Ев-

ропейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях [5]. Органы взвешивали на торсионных весах, рассчитывали относительную массу, определяли линейные размеры с помощью штангенциркуля: длину, ширину и толщину. По формуле объема эллипсоида рассчитывали объем органа:

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

где А – длина, В – ширина и С – толщина [6].

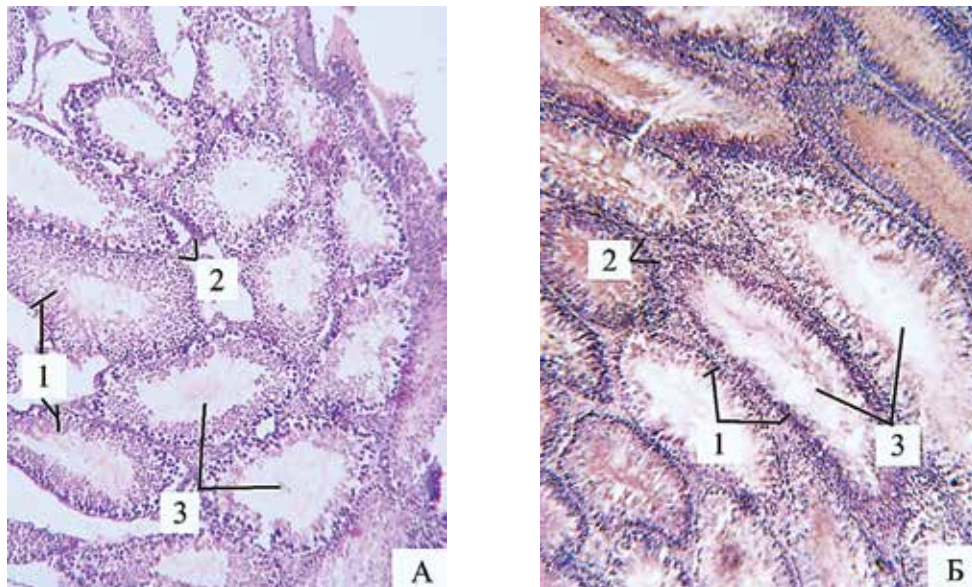
Семенники подвергались стандартной гистологической проводке, полученные срезы толщиной 4-5 мкм окрашивались гематоксилин-эозином и фотографировались с помощью морфометрического комплекса «Olympus CX-41». Морфометрические измерения объектов проводили путём анализа полученных цифровых изображений в компьютерной программе АСКОН «Компас-3D 17.0», используя калибровочный файл, созданный с помощью фотографий объект-микрометра в аналогичных режимах съёмки. В исследовании использовались только те канальцы, по которым срез прошёл перпендикулярно его центральной оси. Измерялись больший и меньший диаметры, площадь канальца, высота и площадь эпителиосперматогенного слоя. Индекс сперматогенеза (I) рассчитывали по формуле:

$$I = \frac{\sum A}{n},$$

где А – количество рядов сперматогенных клеток, обнаруженных в каждом канальце (1 ряд – сперматогонии, 2 – сперматоциты, 3 – сперматиды, 4 – сперматозоиды); n – количество изученных канальцев [6].

Число сустентоцитов подсчитывалось в 75 срезах извитых семенных канальцев. Устанавливали относительное количество интерстициальных эндокриноцитов, приходящихся на поперечный срез одного канальца. Также определялись объёмы ядер указанных клеток по формуле вытянутого эллипсоида вращения [7, 8].

Полученные данные обрабатывали с использованием лицензионной программы «StatSoft Statistica v6.0». Применялись методы параметрической статистики, так как использование критерия Шапиро-Уилка позволило установить нормальное распределение показателей в выборке. Достоверность различий между показателями экспериментальных и контрольных групп определяли с помощью критерия Стьюдента–Фишера



**Рис. 1.** Участок семенника животных репродуктивного возраста на 30-е сутки наблюдения: А – в контроле; Б – после введения циклофосфамида. 1 – эпителиосперматогенный слой, 2 – стенка извитого канальца, 3 – просвет канальца. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение: приближение: Zoom 18,5; объектив: PlanCN 10x/0.25 ∞/-/FN22.

**Fig. 1.** The site of the testis of animals of reproductive age on the 30th day of observation: A – in the control; B – after administration of cyclophosphamide. 1 – epitheliospermatogenous layer, 2 – wall of convoluted tubule, 3 – lumen of tubule. Stained with hematoxylin-eosin. Magnification: approximation: Zoom 18,5; objective: PlanCN 10x/0.25 ∞/-/FN22.

с вероятностью ошибки  $p < 0,05$ , допустимой для медико-биологических исследований.

### Результаты и обсуждение

Семенники являются парными органами, что обуславливает необходимость изучения каждого из них. Однако, полученные данные свидетельствуют, что в контрольных и экспериментальных группах достоверных различий между аналогичными параметрами правой и левой гонады установлено не было, поэтому в дальнейшем будут приведены результаты исследования правого органа.

Семенники крысы располагаются в мошонке, непосредственно соединяющейся с брюшной полостью, имеют овальную форму, в каждом различают краниальный и каудальный полюса, медиальную и латеральную поверхности, вентральный и дорсальный края. Снаружи орган покрыт соеди-

нительнотканной оболочкой, разделяющей его на дольки, содержащие извитые семенные канальцы, которые расположены в разных плоскостях. Эпителиосперматогенный слой плотно прилегает к стенке канальца и представлен sustentоцитами, а также рядами предшественников сперматозоидов, находящихся на разных стадиях сперматогенеза (рис. 1).

Органометрические показатели гонад крыс контрольных групп подвергались незначительным изменениям в связи с закономерными процессами их морфогенеза (табл. 1).

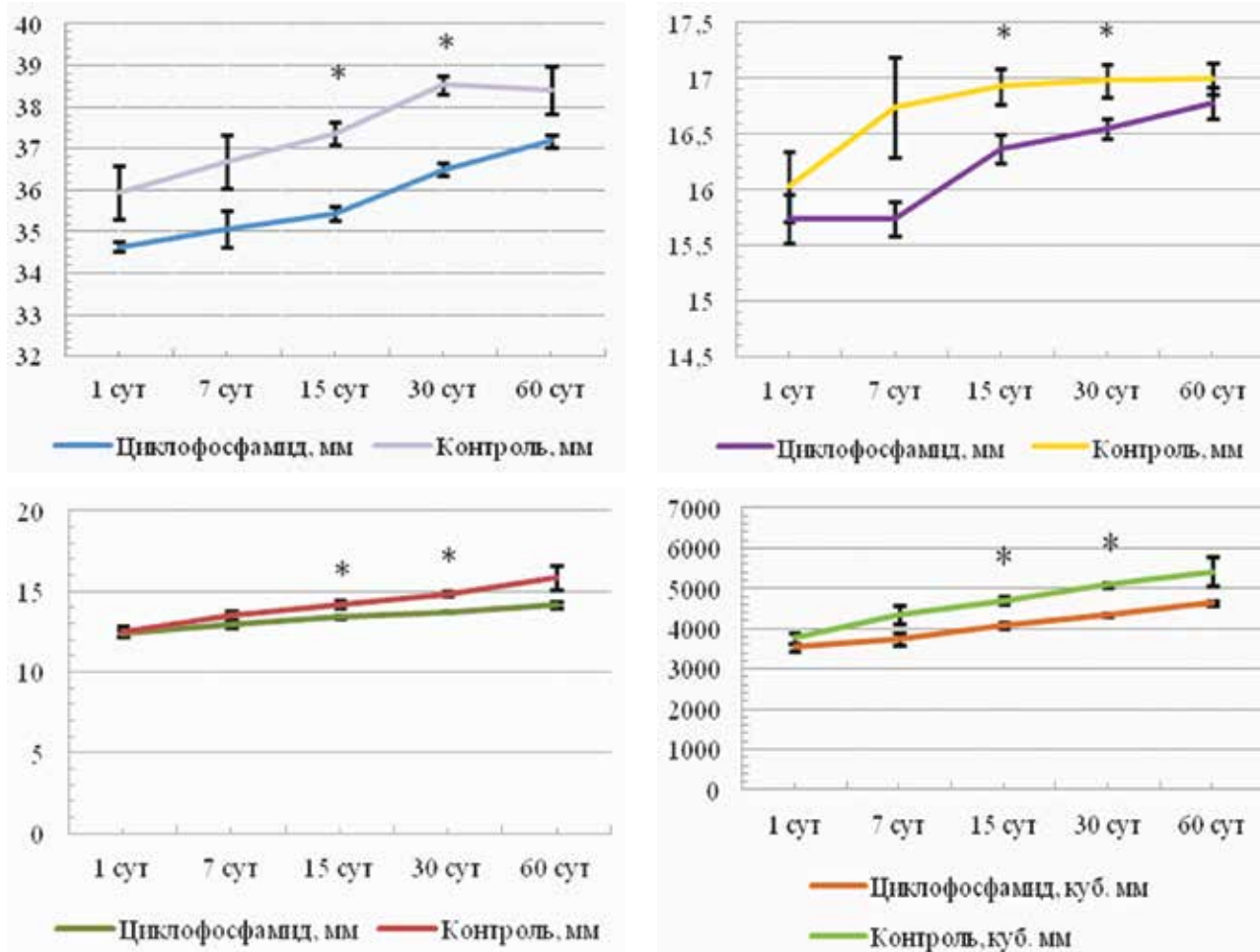
После введения препарата принцип строения семенников не претерпел существенных изменений, однако были отмечены отклонения макроморфометрических показателей органов. Так, статистически значимое уменьшение абсолютной массы на 5,13% и 7,00% было установлено на 15-е и 30-е сутки наблюдения. Значения относительной

Таблица 1 / Table 1

### Органометрические показатели органов животных контрольных групп периода выраженных старческих изменений ( $M \pm m$ , $n=30$ )

Organometric indicators of the animals from control groups in the period of pronounced senile changes ( $M \pm m$ ,  $n=30$ )

Параметры	Сроки наблюдения, сутки				
	1	7	15	30	60
Абсолютная масса, мг	2105,13±82,51	2017,28±48,97	2061,33±23,36	2095,41±29,65	2120,66±52,12
Относительная масса, мг/г	6,44±0,48	5,99±0,25	6,19±0,09	5,11±0,12	4,42±0,19
Длина, мм	35,95±0,64	36,68±0,65	37,36±0,28	38,54±0,22	38,40±0,58
Ширина, мм	16,03±0,31	16,74±0,45	16,93±0,16	16,98±0,15	17,05±0,14
Толщина, мм	12,52±0,32	13,53±0,28	14,20±0,24	14,86±0,16	15,87±0,73
Объём, мм <sup>3</sup>	3777,66±135,65	4349,79±235,61	4702,60±97,58	5091,60±58,23	5424,29±351,23



**Рис. 2.** Динамика длины (А), ширины (Б), толщины (В) и объема (Г) семенников после применения циклофосфамида и в контроле. \* – статистически значимое отличие от контрольных данных ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Dynamics of length (A), width (B), thickness (B) and volume (Г) of testes after cyclophosphamide administration and in control. \* – statistically significant difference from the control data ( $p < 0.05$ ).

массы изменялись однонаправленно и синхронно: снижение показателей составило 8,63% и 12,90% соответственно. Линейные и объёмные параметры органов после применения иммуносупрессора претерпевали сходные изменения. Так, достоверные отклонения были установлены на 15-е и 30-е сутки (рис. 2).

После окончания введения препарата изменения микроморфометрических параметров гонад наблюдались в аналогичные сроки наблюдения, имея тенденцию к снижению в сравнении с данными контрольных групп крыс.

После иммуносупрессии линейные показатели извитых семенных канальцев достоверно уменьшались относительно контрольных данных. Так, больший и меньший диаметры снижались на 4,46%, 6,19% и 4,92%, 5,37% соответственно к 15-м и 30-м суткам наблюдения. Синхронно уменьшались площади канальца и эпителиосперматогенного слоя – на 5,05%, 5,71% и 5,51%, 5,97% (рис. 3). Высота последнего, а также индекс сперматогенеза статистически значимо снижались в сравнении с данными контрольных групп животных. Так, на 15-е и 30-е сутки после прекращения введения иммуносупрессора эти параметры уменьшались на 11,47%, 12,02% и 5,21%, 5,22% соответственно.

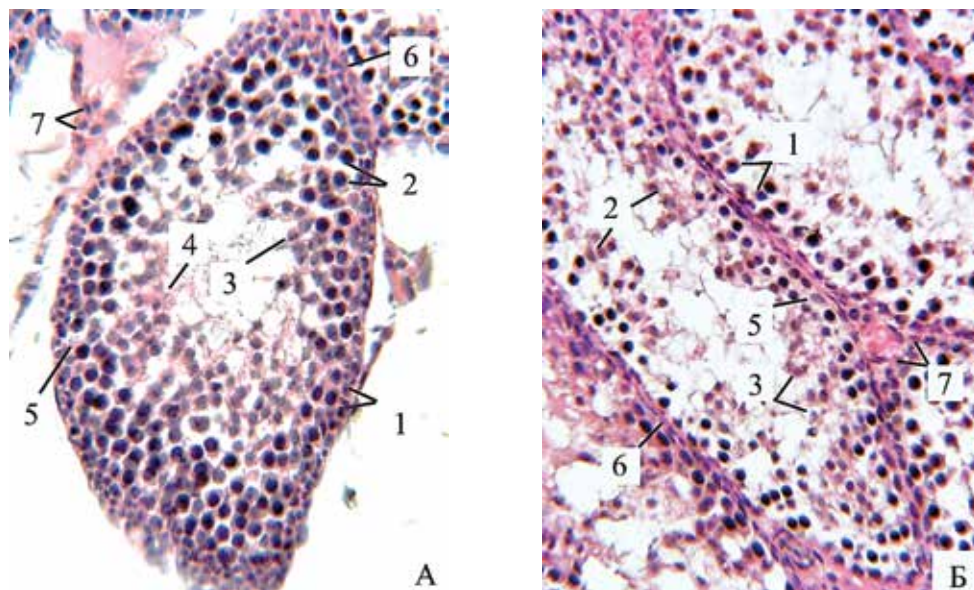
На 60-й день наблюдения, как и на ранних сроках, все исследуемые параметры органа достоверно не отличались от контрольных данных.

Количество сустентоцитов в извитых семенных канальцах гонад крыс контрольной группы статистически значимо превышало аналогичный показатель у животных после иммуносупрессии на 8,05% (15 сут.) и 10,58% (30 сут.). Также было установлено достоверное снижение объема ядер клеток в те же сроки наблюдения на 8,10% и 9,75% соответственно.

Сходная динамика параметров интерстициальных эндокриноцитов отмечалась через 15 и 30 суток после прекращения применения препарата: так, количество клеток снижалось на 8,84% и 9,61%, объем ядер клеток – на 8,04% и 10,23% соответственно.

Развитие изменений морфометрических параметров семенников свидетельствует об интенсивном ответе со стороны органов на иммуносупрессию. Это объясняется дисбалансом характерных для гонад активных синтетических процессов в результате прямого цитотоксического действия препарата и высокой зависимостью строения и функционирования органов от колебаний гормонального фона. Так, широко известно о фарма-





**Рис. 3.** Участок семенника животных периода выраженных старческих изменений на 30-е сутки наблюдения: А – в контроле; Б – после применения циклофосфамида. 1 – сперматогонии, 2 – сперматоциты, 3 – сперматиды, 4 – сперматозоиды, 5 – sustentоцит; 6 – стенка канальца, 7 – интерстициальный эндокриноцит. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение: приближение: Zoom 18,5; объектив: PlanCN40x/0.65  $\approx$  0.17/FN22.

**Fig. 3.** The site of the testis of animals of the period of pronounced senile changes on the 30th day of observation: A – in control; B – after application of cyclophosphamide. 1 – spermatogonia, 2 – spermatocytes, 3 – spermatids, 4 – spermatozoa, 5 – sustentocyte; 6 – tubule wall, 7 – interstitial endocrinocyte. Stained with hematoxylin-eosin. Magnification: approximation: Zoom 18,5; objective: PlanCN40x/0.65  $\approx$  0.17/FN22.

динамическом свойстве циклофосфамида нарушать процессы пролиферации и биосинтеза, особенно быстро делящихся клеток, что может объяснить нарушения морфогенеза семенников как на ранних, так и поздних сроках наблюдения. В то же время, П.В. Логинов (2014) доказал, что негативные экзогенные воздействия нарушают системный гормональный баланс, отражающийся на структуре семенников [9]. С другой стороны, Ю.С. Храмова и соавт. (2016) установили влияние изменений локального гомеостаза на интенсивность сперматогенеза [10]. Данный факт может служить причиной преобразований семенников на микрокопическом уровне в связи с нарушениями репаративных возможностей органа. Морфометрические изменения местных регуляторных компонентов извитых семенных канальцев – sustentоцитов и интерстициальных эндокриноцитов – доказывают факт влияния иммуносупрессора на гормонозависимые процессы морфогенеза семенников. Так, М.Ф. Рыскулов и Н.Н. Шевлюк (2016), а также Д.А. Боков и соавт. (2013) установили зависимость объёма интерстициальных эндокриноцитов от интенсивности экзогенных воздействий в связи со степенью урбанизации региона и загрязнения солями тяжёлых металлов, что свидетельствует о тесной кооперации клеток сперматогенного дифферона и элементов микроокружения в условиях иммуносупрессорных воздействий [11, 12].

### Заключение

1. В ответ на длительную иммуносупрессию отмечается активная реакция со стороны семенников животных периода выраженных старческих

изменений.

2. Статистически значимые различия органомерических показателей гонад крыс экспериментальной и контрольной групп отмечаются как на ранних, так и поздних сроках наблюдения – 15-е и 30-е сутки, что обусловлено прямым цитотоксическим действием циклофосфамида на быстро делящиеся клетки органа и системным гормональным дисбалансом.

3. Данные микроморфометрического исследования, а также цито- и кариометрии позволяют подтвердить результаты органомерии и объясняются дисрегуляцией локального иммунного и эндокринного гомеостаза семенников после длительной иммуносупрессии.

4. Отсутствие статистически достоверных отклонений изученных параметров органа на 1-е и 7-е сутки наблюдения свидетельствуют о сниженной реактивности семенников в результате закономерных возрастных изменений, а нивелирование различий данных между показателями семенников экспериментальной и контрольной групп крыс на 60-е сутки – о развитии реадaptационных процессов в гонадах.

4. Полученные результаты вызывают интерес к изучению морфогенеза органов мужской половой системы в условиях острого иммунодепрессивного воздействия.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bustreo F., Worning A.M., Asamo-Baah A. *Всемирный доклад о старении и здоровье*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2015. 301 с. [Bustreo F., Worning A.M., Asamo-Baah A. *World report on ageing and health*. Geneva:

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2015. 301 p.].

2. Кащенко С.А., Ерохина В.В. Основные морфометрические параметры паращитовидных желез белых крыс после введения им циклофосфана и иммунофана. *Морфология*. 2013; 2: 53-56. [Kashchenko S.A., Erokhina V.V. Main morphometric parameters of parathyroid glands of white rats after application of cyclophosphan and immunophan. *Morfology*. 2013; 2: 53-56 (In Russ.)].

3. Кащенко С.А., Гончарова М.В. Ультрамикроскопические изменения щитовидной железы крыс после иммуносупрессии. *Морфология*. 2013; 3: 49-53. [Kashchenko S.A., Goncharova M.V. Ultramicroscopic changes of thyroid glands in rats after immunosuppression. *Morfology*. 2013; 2: 49-53 (In Russ.)].

4. Мамина В.П. Механизмы регуляции сперматогенеза у лесных полевок при разных фазах численности популяции. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2016; 3: 1-7. [Mamina V.P. Regulating mechanisms of spermatogenesis in red-backed mice on different stages of population estimation. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaja*. 2016; 3: 1-7. (In Russ.)].

5. Директива Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 2010 г. № 2010/63/EU. Санкт-Петербург: НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными»; 2012 г. 48 с. [Directive of European Parliament and European Council on protection of animals used for scientific purposes 2010. № 2010/63/EU. Saint-Petersburg: NP «Union of experts in work with lab animals»; 2012. 48 p. (In Russ.)].

6. Бессалова Е.Ю. Биометрические показатели семенников крыс при парентеральном введении спинномозговой жидкости. *Вісник проблем біології та медицини*. 2011; 4(90): 195-197. [Bessalova E.Yu. Biometric indices of rats' spermaries at parenteral administration of cerebrospinal liquid. *Visnik problem biologii ta medicini*. 2011; 4(90): 195-197. (In Russ.)].

7. Дуденкова Н.А., Шубина О.С. Изменения морфофункционального состояния и продуктивности семенных желез белых крыс при воздействии ацетата свинца. *Фундаментальные исследования*. 2013; 10(6): 1253-1259. [Dudenkova N.A., Shubina O.S. Changes in morphofunctional state and productivity of seminal capsule of white rats under the effect of lead acetate. *Fundamental research*. 2013; 10(6): 1253-1259. (In Russ.)].

8. Кривецкий В.В., Москаленко Р.А., Карпенко Л.И., Закорко

І-М.С. Особливості морфофункціонального дослідження ендокринного компоненту сім'яників в умовах експерименту. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. 2013; 2: 149-153. [Kriveckij V.V., Moskalenko R.A., Karpenko L.I., Zakorko I-M.S. Osoblivosti morfofunkcional'nogo doslidzhennja endokrinного компоненту sim'janikiv v umovah eksperimentu. *Zhurnal klinichnih ta eksperimental'nih medichnih doslidzhen'*. 2013; 2: 149-153. (In Russ.)].

9. Логинов П.В. Изменение функционального состояния семенников белых крыс в условиях иммобилизационного стресса по уровню половых гормонов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; 10-1: 148-149. [Loginov P.V. Changes of functional state of white rats' spermaries in conditions of immobilization stress according to the level of sex hormones. *International journal of applied and fundamental research*. 2014; 10-1: 148-149 (In Russ.)].

10. Храмова Ю.С., Арташян О.С., Юшков Б.Г. и соавт. Влияние тучных клеток на репаративную регенерацию тканей с разной степенью иммунологической привилегированности. *Цитология*. 2016; 58(5): 356-363. [Khramtsova Yu.S., Artashyan O.S., Yushkov B.G. and contributing authors. The effect of mast cells on restorative regeneration of tissues with different immunologic privilege. *Cytology*. 2016; 5: 356-363. (In Russ.)].

11. Боков Д.А., Ковбык Л.В., Семёнова М.В. Влияние хрома и бензола на клетки Лейдига семенников. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2013; 3(41): 104-106. [Bokov D.A., Kovbyk L.V., Semyonova M.V. The effect of chrome and benzol on Leydig's cells of spermaries. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2013; 3(41): 104-106. (In Russ.)].

12. Рыскулов М.Ф., Шевлюк Н.Н. Сравнительная морфофункциональная характеристика клеток Лейдига семенников мелких млекопитающих, населяющих урбанизированные территории. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2016; 4: 53-56. [Ryskulov M.F., Shevlyuk N.N. Comparative morphofunctional characteristics of Leydig's cells of spermaries of small mammals inhabiting urbanized territories. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2016; 4: 53-56. (In Russ.)].

Поступила / Received 15.01.2018  
Принята в печать / Accepted 26.03.2018

Автори заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest

**Контактная информация:** Захаров Алексей Александрович; тел.: +380509678705; +380721098895; e-mail: masterhist@mail.ru; ЛНР, 91045, г. Луганск, кв. 50-летия Обороны Луганска, 1а.

**Corresponding author:** Alexey A. Zakharov; tel.: +380509678705; +380721098895; e-mail: masterhist@mail.ru; 50-years of Luhansk Defense bl., 1a, Luhansk, LPR, 91045.