

Состояние сперматогенеза у белых крыс после экспериментальной обструкции семявыносящих путей

С.И.Гамидов^{1,3}, М.Д.Поливода², О.М.Красова¹, А.Ю.Попова³, Е.А.Дубова³, К.А.Павлов³

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра урологии лечебного факультета, Москва (и.о. зав. кафедрой — проф. А.К.Чепуров);

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, отдел экспериментальной хирургии, Москва (зав. отделом — проф. А.П.Эттингер);

³Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова, Москва (директор — акад. РАН, проф. Г.Т.Сухих)

Цель исследования — изучение влияния уровня и длительности обструкции семявыносящих путей на морфологическое и функциональное состояние ткани яичка. Исследование проведено на 50 половозрелых беспородных лабораторных крысах мужского пола. Животные были разделены на 4 группы: 1-я — с обструкцией семявыносящего протока проксимально, 2-я — с обструкцией семявыносящего протока дистально, 3-я — с обструкцией на уровне придатка яичка, 4-я — контрольная (интактные животные). Через 3 и 6 мес после операции удаляли яички и придатки для гистологического исследования. Во всех исследуемых группах отмечено уменьшение объема яичка и снижение показателей сперматогенеза. Отмечено также, что данные изменения зависят от уровня и срока обструкции семявыносящих путей.

Ключевые слова: обструктивная азооспермия, сперматогенез, морфология яичка, обструкция семявыносящих путей у крыс

Spermatogenesis Status after Experimental Obstruction of the Seminal Tract in White Rats

S.I.Gamidov^{1,3}, M.D.Polivoda², O.M.Krasova¹, A.Yu.Popova³, E.A.Dubova³, K.A.Pavlov³

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Medical Faculty, Department of Urology, Moscow (Acting Head of the Department — Prof. A.K.Chepurov);

²Pirogov Russian National Research Medical University, Department of Experimental Surgery, Moscow (Head of the Department — Prof. A.P.Oettinger);

³Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Acad. V.I.Kulakov, Moscow (Director — Acad. of RAS, Prof. G.T.Sukhikh)

The aim of the study was to estimate the effect of the level and duration of the obstruction of the seminal tract on the morphological and functional state of the testicular tissue. 50 adult outbred male laboratory rats were observed in the study. The rats were divided into 4 groups: 1 — vas deferens obstruction proximally, 2 — vas deferens obstruction distally, 3 — epididymis obstruction, 4 — controls (intact animals). The testes and epididymis were removed in 3 and 6 months for histological examination. Testicular volume and spermatogenesis status decreased in all groups. Also, these changes depend on the level and duration of the obstruction of the seminal tract.

Key words: obstructive azoospermia, spermatogenesis, testicular morphology, obstruction of the seminal tract in rats

На сегодняшний день наиболее сложной для лечения формой мужского бесплодия является азооспермия [1].

Для корреспонденции:

Красова Ольга Михайловна, аспирант кафедры урологии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 129226, Москва, ул. 1-я Леонова, 16

Телефон: (499) 187-2996

E-mail: silver-shaded@yandex.ru

Статья поступила 04.02.2015, принята к печати 22.04.2015

Азооспермию в зависимости от этиологии и патогенеза разделяют на обструктивную и необструктивную [2]. В основе обструктивной азооспермии (ОА) лежит нарушение проходимости семявыносящих путей на различном уровне, что обусловлено разнообразием этиологии данного заболевания [3]. Вспомогательные репродуктивные технологии — единственная возможность для пациентов с ОА иметь собственных генетических детей. Однако применяемые пункционные методы биопсии яичка не всегда эффективны в плане получения пригодных для ИКСИ (от англ. ICSI — IntraCytoplasmic Sperm Injection, интрацитоплазматическая инъекция сперма-

тозоида) сперматозоидов. Анализируя литературные данные и опираясь на собственный опыт, мы выяснили, что на эффективность лечения могут влиять этиология, уровень и длительность поражения семявыносящих путей [4–6].

Цель исследования — изучение влияния уровня и длительности обструкции семявыносящих путей на морфологическое и функциональное состояние ткани яичка. Основной задачей было сравнение гистологической картины и объема яичек при различных уровнях и сроках обструкции семявыносящих путей.

Материалы и методы

Исследование проведено на 50 половозрелых беспородных лабораторных крысах мужского пола массой 410–640 г. Всех животных содержали при 12-часовом световом дне на стандартном рационе с брикетированным кормом при свободном доступе к воде и пище. При выполнении эксперимента учитывали правила проведения работ с использованием экспериментальных животных и его соответствие принципам биоэтики.

Животные были разделены на 4 группы. В 1-й группе ($n = 14$) моделировали обструкцию семявыносящего протока (СП) проксимально, во 2-й группе ($n = 14$) — обструкцию СП дистально (на уровне выхода из хвоста придатка яичка). В 3-й группе ($n = 14$) моделировали обструкцию на уровне придатка яичка. В 4-ю группу ($n = 8$), контрольную, вошли интактные животные. Животных наблюдали в течение 3 и 6 мес с момента операции. В соответствии со сроками наблюдения 1, 2, 3-я группы были разделены на две подгруппы: -3 и -6.

Обезболивания достигали путем внутримышечного введения раствора Zoletil 100 в дозе 2 мг/кг массы тела и Rometar 2% — 0,15 мл/кг. Животных размещали на операционном столике, бритвой удаляли волосяной покров. Операцию проводили в асептических условиях. По вентральной поверхности мошонки производили продольный разрез до 2 см с переходом на паховую область. У животных 1-й группы выделяли семенной канатик до наружного отверстия пахового канала. Тупым путем выделяли СП, перевязывали двумя лигатурами, рассекали СП. У животных 2-й группы выделяли яичко, придаток и СП в области выхода из хвоста придатка яичка. На СП накладывали две викриловые лигатуры, рассекали СП. У животных 3-й группы выделяли яичко и придаток. Между яичком и головкой придатка накладывали две викриловые лигатуры, придаток отсекали между ними. Рану послойно ушивали непрерывным викриловым швом.

Интраоперационно с помощью штангенциркуля измеряли поперечные и продольные размеры яичек. Объем яичек высчитывали путем умножения трех измерений яичка и коэффициента эллипсоидности (0,479). Животных наблюдали в течение 3 и 6 мес после операции. По окончании сроков наблюдения под золетил–рометаровым наркозом удаляли яички, придатки и СП; измеряли линейные размеры яичек. Полученный материал фиксировали в жидкости Боуэна в течение 24 ч.

Гистологические препараты готовили по общепринятой методике. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На полученных гистологических препаратах подсчитывали 100 поперечных срезов семенных

канальцев (СК). Оценивали гистологические изменения в каждом СК путем отдельного подсчета количества клеток. Был произведен подсчет количества СК, содержащих 4 стадии развития половых клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды), 3 стадии (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды), 2 стадии (сперматогонии и сперматоциты), 1 стадию (сперматогонии) и содержащих только клетки Сертоли (КС). Определяли долю (в процентном отношении) СК каждого из перечисленных типов, а также индекс сперматогенеза (ИС) — сумму всех подсчитанных в 100 срезах СК стадий клеток сперматогенеза (в процентах).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica for Windows v. 7.0». Все количественные показатели представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Анализ данных проводили с использованием критерия Вилкоксона.

Результаты исследования и их обсуждение

Динамику изменения объема яичка оценивали по разнице объема исходных значений и после операции (3 и 6 мес), а также в зависимости от уровня обструкции. В табл. 1 приведены полученные нами данные. Во всех исследуемых группах объем яичка был ниже исходных параметров ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения наблюдали при обструкции на уровне придатка яичка: объем яичка в группах 3-3 и 3-6 был снижен более чем в 2 раза. Однако достоверных различий объема яичка в 3 и 6 мес на всех уровнях обструкции не отмечено. Эти данные демонстрируют отсутствие значимого влияния срока обструкции семявыносящих путей на различных уровнях на объем яичка. При сравнении объема яичек в зависимости от уровня обструкции нами были получены следующие результаты. В 3-й группе (обструкция придатка) объем яичек достоверно отличался от объема яичек во 2-й группе ($p < 0,05$). В свою очередь, во 2-й группе объем яичка оказался достоверно меньше, чем в 1-й ($p < 0,05$). Таким образом, показано, что снижение объема яичка — одного из прогностических факторов сохранности сперматогенеза — зависит от уровня обструкции семявыносящих путей. Чем дистальнее обструкция семявыносящих путей, тем более выражены изменения объема яичек.

Полученные данные гистологического исследования мы сравнивали с группой контроля (4-я группа), а также между

Таблица 1. Объем яичек в исследуемых группах, см³

Группа	Исходный объем	Объем после обструкции
1-3	1,46 \pm 0,08	1,16 \pm 0,22
1-6	1,44 \pm 0,26	1,11 \pm 0,34
2-3	1,47 \pm 0,08	0,63 \pm 0,08
2-6	1,50 \pm 0,19	0,59 \pm 0,13
3-3	1,45 \pm 0,05	0,55 \pm 0,08
3-6	1,47 \pm 0,12	0,53 \pm 0,06

$p < 0,05$ при сравнении всех соответствующих показателей до и после моделирования обструкции семявыносящих путей

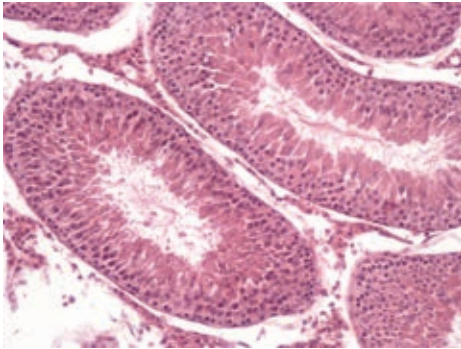


Рис. 1. Поперечный срез семенных канальцев яичка крысы контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

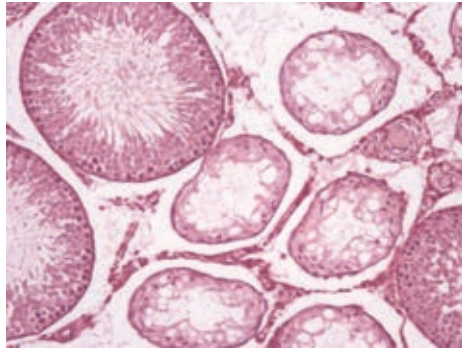


Рис. 2. Поперечный срез семенных канальцев яичка крысы группы 2-3. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

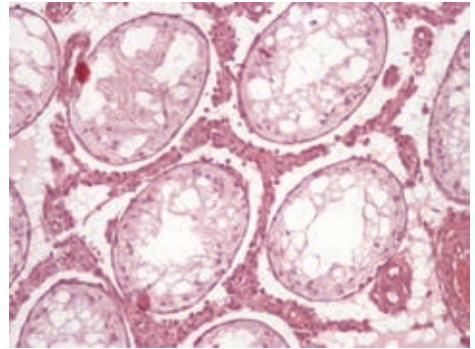


Рис. 3. Поперечный срез семенных канальцев яичка крысы группы 3-6. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

группами. В контрольной группе практически все СК содержали клетки герминогенного эпителия на всех стадиях созревания, включая сперматозоиды (рис. 1). Канальцы придатка яичка в области головки выстланы призматическим, а в области хвоста — кубическим эпителием.

Значения, полученные при оценке гистологической картины в экспериментальных группах, приведены в табл. 2. Во всех исследуемых группах все параметры сперматогенеза были ниже контроля. Это выражалось в снижении ИС, количества СК с четырьмя стадиями развития герминогенных клеток, увеличении количества СК с запускованием и появлении СК лишь с одной и двумя стадиями развития клеток. Во всех группах, кроме контроля, была отмечена очаговая гиперплазия клеток Лейдига.

Через 3 мес обструкции проксимальной части семявыносящего протока ИС составил $2,87 \pm 0,62\%$, что было ниже контроля ($p < 0,05$). Всего лишь половина СК содержали клетки герминогенного эпителия на всех стадиях созревания, включая сперматозоиды (рис. 2). В части канальцев определялось созревание клеток до уровня округлых сперматид. Отмечено появление СК с двумя и одной стадией созревания зародышевых клеток. СК, содержащих только КС с утолщенной базальной мембраной с выраженными дистрофическими изменениями, было $15,43 \pm 11,34\%$. В придатках яичка часть канальцев умеренно расширены, заполнены умеренным количеством сперматозоидов. В отдаленные сроки изменения сперматогенеза были более выражены и по всем оцениваемым параметрам отличались от группы 1-3. Так, ИС составил $1,71 \pm 1,27\%$. Около трети СК содержали клетки на всех стадиях созревания и сперматозоиды в резко уменьшенном количестве. СК с тремя стадиями было меньше, чем в группе 1-3 ($p < 0,05$). Отмечено также появление канальцев с двумя и одной стадией. Возросло количество СК, содержащих только КС. В части таких канальцев полностью отсутствовал просвет. Гистологическая картина придатков яичек была идентична группе 1-3.

Обструкция дистальной части СП (2-я группа) привела к тяжелому поражению сперматогенеза. Все параметры сперматогенеза отличались от контрольной группы. Так, в группе 2-3 ИС был меньше единицы. СК, содержащих 4 стадии созревания, включая единичные сперматозоиды, было $14,29 \pm 3,65\%$. Больше половины СК содержали толь-

ко КС с утолщенной базальной мембраной с выраженными дистрофическими изменениями. Через 6 мес обструкции дистальной части СП статистически значимых различий по сравнению с группой 2-3 выявлено не было. Канальцы придатков в группах 2-3 и 2-6 умеренно расширены, в просвете — единичные дистрофические герминогенные клетки. Таким образом, показано, что обструкция дистальной части СП достоверно приводит к тяжелому поражению сперматогенеза и выраженному снижению всех его показателей, однако степень выраженности этих изменений не зависела от срока обструкции.

В 3-й группе (обструкция придатков яичек) наблюдали наиболее выраженное поражение сперматогенеза. Через 3 мес обструкции ИС был снижен почти в 4 раза по сравнению с контролем. Зрелые сперматозоиды отмечены менее чем в 10% канальцев. При этом почти 70% канальцев характеризовались отсутствием клеток герминогенного эпителия, они содержали только КС с утолщенной базальной мембраной с выраженными дистрофическими изменениями. В отдаленные сроки наблюдения было отмечено самое тяжелое поражение сперматогенеза по сравнению со всеми группами (рис. 3). Все показатели сперматогенеза имели более выраженные изменения, чем в группе 3-3 ($p < 0,05$). ИС стремился к нулю и составлял $0,08 \pm 0,09\%$. Клеток герминогенного эпителия не выявлено ни в одном канальце. Лишь у двух животных обнаружены единичные СК с созреванием клеток до 3, 2 и 1 стадий. Практически все СК были резко уменьшены в диаметре, в них присутствовали только КС с выраженными дистрофическими изменениями. В части таких СК полностью отсутствовал просвет. Канальцы придатков выстланы кубическим и уплощенным эпителием, их просвет пуст. Таким образом, чем длительнее срок обструкции на уровне придатка, тем ниже ИС, меньше СК с 4 стадиями развития герминогенных клеток и больше количество пустых СК.

После оценки показателей сперматогенеза в группах мы сравнили степень выраженности этих изменений в зависимости от уровня обструкции. Так, ИС в группе 1-3 был выше других групп ($p < 0,05$). При этом в группах 2-3 и 3-3 ИС существенно не различался. Самый низкий показатель количества СК с 4 стадиями созревания был в группе 3-3, в свою очередь, в группе 2-3 он был ниже, чем в группе 1-3 ($p < 0,05$).

Таблица 2. Показатели сперматогенеза в исследуемых группах

Группа	Число тестикул	Индекс сперматогенеза, %	Количество семенных канальцев, содержащих половые клетки на разных этапах развития, %				
			4 стадии	3 стадии	2 стадии	1 стадия	клетки Сертоли
1-3	14	2,87 ± 0,62*	51,93 ± 21,87*	19,79 ± 12,00*	7,21 ± 5,50*	5,50 ± 4,30*	15,43 ± 11,34*
1-6	14	1,71 ± 1,27*^	34,34 ± 28,62*	7,43 ± 6,19*^	3,93 ± 3,99*	3,71 ± 4,03*	50,57 ± 33,09*^
2-3	14	0,95 ± 0,23*	14,29 ± 3,65*	6,86 ± 4,74*	4,71 ± 2,05*	7,71 ± 3,85*	66,50 ± 10,04*
2-6	14	0,92 ± 0,65*	13,43 ± 13,55*	7,00 ± 3,64*	5,36 ± 3,93*	6,86 ± 6,20*	67,21 ± 19,98*
3-3	14	0,85 ± 0,24*	9,29 ± 2,73*	11,00 ± 7,66*	4,21 ± 3,02*	6,07 ± 5,14*	69,29 ± 8,56*
3-6	14	0,08 ± 0,09*^	0*^	1,64 ± 3,89^	1,00 ± 1,41*^	1,07 ± 1,33*^	96,29 ± 3,52*^
4-3	8	3,98 ± 0,02	98,63 ± 0,96	1,25 ± 0,77	0	0	0,13 ± 0,34
4-6	8	3,97 ± 0,01	98,57 ± 0,73	1,22 ± 0,61	0	0	0,11 ± 0,23

* — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы того же срока наблюдения;
^ — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем 3-месячного обструктивного интервала внутри одной группы

Это подтверждало наше предположение о том, что более дистальные уровни обструкции характеризуются более выраженными нарушениями сперматогенеза. Количество СК с КС было больше в группе 2-3, чем в 1-3 ($p < 0,05$), а в группах 2-3 и 3-3 не различалось.

Мы также оценили показатели сперматогенеза в зависимости от уровня обструкции в отдаленные сроки наблюдения. Из табл. 2 видны более выраженные изменения ИС, СК с 4 стадиями и пустых СК в группе 3-6 по сравнению с другими группами ($p < 0,05$). Эти изменения также более выражены в группе 2-6, чем в 1-6 ($p < 0,05$). Итак, полученные данные демонстрировали более выраженное поражение сперматогенеза в отдаленные сроки наблюдения.

Заключение

Полученные данные экспериментального исследования свидетельствуют о значимом влиянии уровня и длительности обструкции семявыносящих путей на морфологическое состояние ткани яичка и сперматогенез. Это выражается в изменении важнейших показателей фертильности: снижении индекса сперматогенеза, количества семенных канальцев, содержащих сперматозоиды, и увеличении канальцев, содержащих только клетки Сертоли. Следует подчеркнуть, что нарушение проходимости на уровне придатка яичка приводит к наиболее тяжелому поражению сперматогенеза. В отдаленные сроки наблюдения отмечена полная атрофия семенных канальцев. В то же время для более проксимальных уровней обструкции характерны менее выраженные изменения. На наш взгляд, результаты экспериментальной работы можно использовать в качестве прогностических факторов при выборе метода биопсии яичка у пациентов с обструктивной азооспермией.

Литература

1. Коган М.И., Сизякин Д.В., Сакунов С.В. и др. Структура причинных факторов азооспермии: Тезисы Всерос. конф. «Мужское здоровье», Москва, 19–21 ноября 2003 г. М., 2003. С.45–46.
2. American Urological Association Education and Research, Inc. The management of obstructive azoospermia: AUA best practice statement. Linthicum (MD), 2010. 22 p.

3. Аляев Ю.Г., Амосов А.В., Алленов С.Н. и др. Получение сперматозоидов методом пункционной биопсии придатка яичка у больных обструктивной азооспермией // Андрол. и генит. хир. 2009. №2. С.97.
4. Miyaoka R., Esteves S.C. Predictive factors for sperm retrieval and sperm injection outcomes in obstructive azoospermia: do etiology, retrieval techniques and gamete source play a role? // Clinics (Sao Paulo). 2013. V.68. Suppl.1. P.111–119.
5. Nicopoulos J.D., Gilling-Smith C., Ramsay J.W. Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis // BJU Int. 2004 Jun. V.93 (9). P.1282–1286.
6. Peng J., Yuan Y., Zhang Z. et al. Microsurgical vasoevididymostomy is an effective treatment for azoospermic patients with epididymal obstruction and prior failure to achieve pregnancy by sperm retrieval with intracytoplasmic sperm injection // Hum Reprod. 2014 Jan. V.29 (1). P.1–7.

Информация об авторах:

Гамидов Сафар Исраилович, доктор медицинских наук, профессор кафедры урологии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова, заведующий отделением андрологии и урологии Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова
Адрес: 129226, Москва, ул. 1-я Леонова, 16
Телефон: (499) 187-2996
E-mail: docand@rambler.ru

Поливода Михаил Дмитриевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной хирургии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-3574
E-mail: 606133@rambler.ru

Попова Алина Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения андрологии и урологии Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова
Адрес: 117513, Москва, ул. Академика Опарина, 4
Телефон: (495) 438-8506
E-mail: alina-dock@ya.ru

Дубова Елена Алексеевна, старший научный сотрудник 2-го патологоанатомического отделения Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова
Адрес: 117513, Москва, ул. Академика Опарина, 4
Телефон: (495) 438-2892
E-mail: e_dubova@oparina4.ru

Павлов Константин Анатольевич, старший научный сотрудник 2-го патологоанатомического отделения Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова
Адрес: 117513, Москва, ул. Академика Опарина, 4
Телефон: (495) 438-2892
E-mail: kpravlov@oparina4.ru