

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-77-81

УДК 616–092:543.544

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© С. В. Чигринцев, Г. В. Брюхин, С. Н. Завьялов, 2019

Морфофункциональное состояние репродуктивной системы самцов белых крыс при воздействии бисфенола А и триклозана

С. В. Чигринцев*, Г. В. Брюхин, С. Н. Завьялов

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск, Россия

Целью данного исследования явился анализ морфофункционального состояния яичек половозрелых самцов крыс при воздействии бисфенола А и триклозана.

Материал и методы. Работа выполнена на белых половозрелых лабораторных крысах-самцах Вистар (n=28). Экспериментальные животные были разделены на три группы исследования – контрольную (интактную) и две опытных. Крысы опытных групп в течение двух месяцев ежедневно получали с пищей бисфенол А и триклозан (Sigma-Aldrich, США) в количестве 200 мг/кг. Определяли общее количество сперматозоидов в 1 мл спермы с подсчетом их атипичных форм, а также проводили морфометрические измерения (подсчет численности и площади сечения клеток Лейдига, вычисляли ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ)). Концентрации бисфенола А и триклозана в яичках измеряли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Полученные данные были подвергнуты статистической обработке при помощи программы IBM SPSS Statistics v.21 (IBM Corp., Armonk, NY, США).

Результаты. Различия в концентрации бисфенола А и триклозана в тканях яичек между группами сравнения были статистически значимыми ($p < 0.001$). Воздействие исследуемых эндокринных дизрапторов приводило к снижению массы яичек. В группе самцов крыс, подвергшихся воздействию бисфенола А, наблюдалось уменьшение общего количества сперматозоидов ($p = 0.004$) с увеличением их атипичных форм ($p = 0.014$) по сравнению с группой интактных животных. Бисфенол А и триклозан вызвали уменьшение численности клеток Лейдига ($p = 0.001$; $p = 0.001$) соответственно и статистически значимое изменение ЯЦИ. При этом воздействие бисфенола А приводило к снижению ЯЦИ в клетках Лейдига, тогда как влияние триклозана наоборот приводило к увеличению его значения по сравнению с группой интактных животных.

Заключение. Бисфенол А и триклозан оказывают негативное влияние на морфофункциональное состояние мужских половых желез половозрелых крыс, которое проявляется уменьшением массы яичек, общего количества сперматозоидов на фоне увеличения их атипичных форм, а также снижением численности клеток Лейдига с изменением их ЯЦИ.

Ключевые слова: бесплодие, фертильность, яички, сперматозоиды, клетки Лейдига, крысы, эндокринные дизрапторы, бисфенол А, триклозан.

Morphofunctional Characteristics of the Male Reproductive System of White Rats Treated with Bisphenol A and Triclosan

© S. V. Chigrinets*, G. V. Bryukhin, S. N. Zav'yalov, 2019

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The aim of this study was to analyze the morphofunctional state of the testes of mature male rats treated with bisphenol A (BPA) and triclosan (TCS).

Material and methods. The work was performed on mature male rats (n=28). Experimental animals were divided into three groups – control (intact) and two experimental ones. For two months, rats of the experimental groups received daily bisphenol A and triclosan (Sigma-Aldrich, USA) with food in the amount of 200 mg/kg. The total count of spermatozoa in 1 ml of sperm was determined with the calculation of their atypical forms, and morphometric measurements were made (the total number and area of Leydig cells with their nuclear-cytoplasmic ratio). The concentrations of bisphenol A and testicular triclosan were measured by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). The obtained data was subjected to statistical processing using IBM SPSS Statistics v.21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results. Differences between the comparison groups in the concentration of bisphenol A and triclosan in testicular tissues were statistically significant ($p < 0.001$). The endocrine disruptors studied reduced the mass of the testes. A group of male rats exposed to bisphenol A showed a decrease in the total number of spermatozoa ($p = 0.004$) with an increase in their atypical forms ($p = 0.014$) compared with a group of intact animals. Bisphenol A and triclosan caused a decrease in the total number of Leydig cells ($p = 0.001$; $p = 0.001$) respectively, and a statistically significant change in the nuclear-cytoplasmic ratio. Moreover, bisphenol A led to a decrease in the nuclear-cytoplasmic ratio of Leydig cells, whereas triclosan, on the contrary, increased its value in comparison with a group of intact animals.

Conclusion. Bisphenol A and triclosan have a negative effect on the morphofunctional state of the male testes of sexually mature rats (decrease in testicular mass, total count of spermatozoa on the background of an

increase in their atypical forms, as well as a decrease in the total number of Leydig cells with a change in their nuclear-cytoplasmic ratio).

Key words: *infertility, fertility, testis, sperm, Leydig cells, rats, endocrine disruptor, bisphenol A, triclosan.*

***Автор для переписки:**

Чигринцев Станислав Владимирович
Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии,
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, ул. Воровского, 64, г. Челябинск, 454092, Российская Федерация
E-mail: chigrinstas@gmail.com

***Corresponding author:**

Stanislav Chigrinets
Department of Histology, Embryology and Cytology,
South Ural State Medical University, ul. Vorovskogo, 64,
Chelyabinsk, 454092, Russian Federation
E-mail: chigrinstas@gmail.com

Введение

Нарушение репродуктивного здоровья мужчин является одной из актуальных проблем медицины во всем мире. Известно, что при бесплодии на долю мужского фактора приходится не менее 50% случаев, при которых обнаруживается патозооспермия – нарушение качества эякулята. По-прежнему, доля мужского бесплодия с неустановленной причиной является самой весомой и составляет 30–40%. Такое бесплодие может быть вызвано рядом причин – активными формами ксилорода, генетическими и эпигенетическими факторами, а также эндокринными дисрапторами [12].

К наиболее известным нестойким убиквитарным эндокринным дисрапторам относятся фталаты, бисфенол А (BPA) и триклозан (TCS) [5, 6].

BPA и TCS – нестойкие фенольные соединения, которые широко используются человеком в повседневной жизни и обнаруживаются в образцах мочи более чем в 90% случаев [9, 14]. Влияние этих веществ на процессы сперматогенеза и фертильный потенциал мужчин в настоящее время остается недостаточно изученным.

Цель исследования состояла в анализе морфофункционального состояния яичек половозрелых самцов крыс при воздействии BPA и TCS.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на белых половозрелых лабораторных крысах-самцах Вистар массой 150–193 г (n=28). Крысы были разделены на 3 рандомизированные группы (контрольную и две испытываемые группы). Крысы 1-й испытываемой группы (n=10) получали BPA, а крысы 2-й испытываемой группы (n=8) – TCS. Контрольную группу составили интактные животные в количестве 10 особей. Подопытные животные в течение двух месяцев ежедневно получали с пищей BPA и TCS в коли-

честве 200 мг/кг со степенью гомогенности > 97% (Sigma-Aldrich, США).

Работа с лабораторными животными выполнялась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.77).

Животных выводили из эксперимента на 46-е сутки путем передозировки эфирного наркоза, выделяли яички с придатками, затем определяли массу правого и левого яичек на торсионных весах. После взвешивания отпрепарированных семенников правое яичко фиксировали в жидкости Буэна с последующей заливкой в парафин стандартным способом. Зрелые сперматозоиды получали из придатка яичка по общепринятой методике [1] с оценкой общего количества сперматозоидов в 1 мл и подсчетом их атипичных форм [2, 18]. Серийные срезы яичек окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрические измерения выполнялись при помощи лицензированного программного обеспечения «Видео Тест-Морфология 5.0» и включали подсчет численности клеток Лейдига и площади их сечения с вычислением их ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ) в 10 полях зрения (площадь одного поля зрения – 0.88 мм²) с вычислением средних значений из расчета на одно поле зрения при об. 10; ок. 10.

С целью измерения концентрации исследуемых веществ в тканях яичек левое яичко было полностью гомогенизировано в стеклянно-тефлоновом гомогенизаторе, а затем было подвергнуто центрифугированию при ускорении 2000 g в течение 10 мин при температуре 4°C, с тем, чтобы удалить детрит и ядра. Образовавшаяся надосадочная жидкость была использована для измерения концентрации BPA и TCS методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке при помощи программы IBM SPSS Statistics v.21 (IBM Corp., Armonk, NY, США). Для определения статистически значимых различий между группами использовался U-критерий Манна–Уитни. Для установления связи между показателями вычислялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Различия в концентрации BPA и TCS в тканях яичек между группами сравнения были статистически значимыми ($p < 0.001$). Полученные

Таблица 1

Сравнительная характеристика изучаемых биохимических и морфометрических показателей в контрольной и опытных группах

Изучаемые показатели	Контроль (n=10)	Воздействие бисфенола А (n=10)	p	Воздействие триклозана (n=8)	p
	Me (Q ₁ –Q ₃)	Me (Q ₁ –Q ₃)		Me (Q ₁ –Q ₃)	
Концентрация бисфенола А, нг/мл	0.01 (0.00–0.03)	0.28 (0.22–0.29)	<0.001*	0.02 (0.01–0.05)	0.466
Концентрация триклозана, нг/мл	0.06 (0.05–0.08)	0.07 (0.04–0.08)	0.649	0.27 (0.23–0.46)	<0.001*
Масса правого яичка, г	1.61 (1.55–1.78)	1.44 (1.38–1.62)	0.049	1.45 (1.42–1.49)	0.001*
Количество клеток Лейдига (n)	154.8 (149.8–159.2)	139.8 (139.0–141.0)	0.001*	142.1 (137.2–146.6)	0.001*
Площадь сечения клеток Лейдига, мкм ²	1410.65 (1396.87–1431.13)	1358.24 (1343.29–1388.25)	0.010*	1363.55 (1340.54–1401.58)	0.153
ЯЦИ	0.48 (0.48–0.49)	0.45 (0.45–0.46)	0.001*	0.54 (0.53–0.58)	<0.001*
Общее количество сперматозоидов в 1 мл, млн	15.90 (14.70–17.40)	11.40 (9.80–14.30)	0.004*	15.30 (12.15–17.00)	0.475
Атипичные формы сперматозоидов, %	12.0 (9.0–12.0)	19.0 (15.0–19.0)	0.014*	12.5 (11.0–13.5)	0.202

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0.05$.

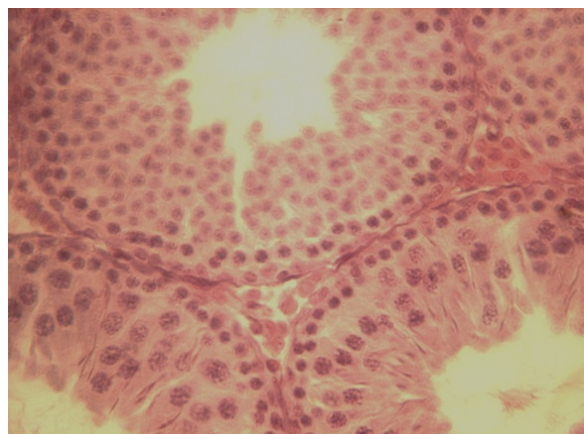


Рис. 1. Яичко интактной крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, ок. 10.

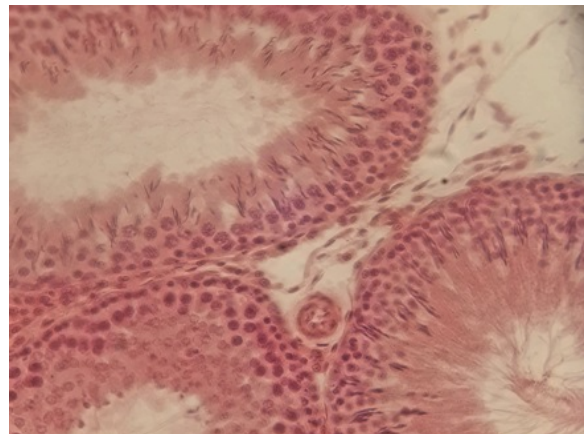


Рис. 2. Яичко крысы, подвергшейся воздействию триклозана. Снижение численности клеток Лейдига. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40; ок. 10.

результаты убедительно свидетельствуют о снижении абсолютной массы яичек по сравнению с группой контроля. Опытная группа крыс, подвергавшихся воздействию ВРА, продемонстрировала снижение общего количества сперматозоидов с увеличением их атипичных форм по сравнению с группой интактных животных. Тогда, как вторая опытная группа животных, подвергавшихся воздействию TCS, не показала статистически значимого снижения параметров спермы. Вместе с тем, оба эндокринных дизраптора привели к снижению численности клеток Лейдига и их статистически значимому изменению ЯЦИ (рис. 1, 2). Причем воздействие ВРА приводило к снижению ЯЦИ клеток Лейдига, тогда как влияние триклозана наоборот увеличивало его значение по сравнению с группой интактных животных (табл. 1).

Используя коэффициент ранговой корреляции Спирмена были обнаружены следующие корреляционные связи между концентрациями ВРА и TCS в тканях яичка и рядом морфофункциональных показателей (табл. 2).

Нами установлено наличие обратной корреляционной связи между ЯЦИ клеток Лейдига и концентрацией ВРА, а так же прямой корреляции между ЯЦИ и концентрацией TCS. Снижение ЯЦИ клеток Лейдига может свидетельствовать об угнетении их эндокринной функции, тогда как его увеличение (в случае воздействия TCS) – об их гиперфункции. Nakamura и соавт., (2010); El-Beshbishy и

Таблица 2

Корреляционные связи между концентрациями бисфенола А и триклозана в тканях яичка и изучаемыми морфофункциональными показателями

Изучаемые показатели	Бисфенол А		Триклозан	
	г	р	г	р
Масса правого яичка, г	-0.453	0.050	-0.779	<0.001*
Количество клеток Лейдига (n)	-0.731	<0.001*	-0.779	<0.001*
Площадь сечения клеток Лейдига, мкм ²	-0.592	0.006*	-0.346	0.159
ЯЦИ	-0.731	<0.001*	0.866	<0.001*
Общее количество сперматозоидов в 1 мл, млн	-0.661	0.001*	-0.173	0.492
Атипичные формы сперматозоидов, %	0.562	0.010*	0.310	0.211

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0.05$.

соавт., (2012); Castro и соавт., (2013) показали в своих работах, выполненных на взрослых самцах крыс, снижение уровня тестостерона в плазме крови и/или в тканях яичка [3, 4, 11].

В отношении общего количества сперматозоидов наши данные не противоречат результатам, полученными Kouyouma и соавт., (2014), Liu и соавт., (2013), Qiu и соавт., (2013), Tiwari и Vanage (2013), Wisniewski и соавт., (2015) [7, 10, 15, 16, 17] и свидетельствуют об угнетающем влиянии ВРА на сперматогенез у крыс. Вместе с тем Wisniewski и соавт., (2015) в своей работе продемонстрировали ВРА дозозависимое увеличение атипичных форм сперматозоидов, что также согласуется с результатами данной работы.

Изучая влияние TCS на репродуктивную функцию, Pernopcinі и соавт. в своем эксперименте на крысах не обнаружили статистически значимых различий по ряду параметров спермы (общему количеству, подвижности, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов), однако максимальная доза TCS, которой были подвергнуты животные, составляла 8.0 мг/кг [13]. Вместе с тем, другая группа авторов во главе с Lan, (2015) показали в своей работе, выполненной на молодых крысках, снижение продукции спермы при воздействии TCS в дозе 200 мг/кг [8]. В целом исследований по изучению влияния TCS на генеративную и эндокринную функции у крыс не достаточно.

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что нестойкие убиквитарные эндокринные дизрапторы, такие как бисфенол А и триклозан, оказывают в условиях эксперимента негативное влияние на морфофункциональное состояние яичек, что проявляется снижением массы органа и общего числа сперматозоидов с увеличением их атипичных форм. Наряду с этим данные репротоксиканты вызывали нарушение функции эндокринного аппарата яичек (сни-

жение численности клеток Лейдига и их функциональной активности).

Концентрации исследуемых эндокринных дизрапторов в тканях яичек существенно различались в группах сравнения, что, с одной стороны, может свидетельствовать об избирательном накоплении их в семенниках, а, с другой – создавать условия для прямого длительного токсического воздействия бисфенола А и триклозана на генеративный и эндокринный аппараты яичек. Полученные результаты убедительно доказывают, что бисфенол А и триклозан можно рассматривать в качестве этиологических факторов, обуславливающих нарушение мужской фертильности.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Луцкий Д. Л., Николаев А. А. Морфологическое исследование эякулята : Методическое пособие. Астрахань; 1999. 46 [Lutskii DL, Nikolaev AA. Morfologicheskoe issledovanie eyakulyata: Metodicheskoe posobie. Astrakhan'; 1999]. (in Russian)
2. Тиктинский О. Л., Михайличенко В. В. Андрология. СПб.: Media-press; 1999. 431 [Tiktinskii OL, Mikhailichenko VV, Kalinina SN. Andrologia. Saint Petersburg: Media-press; 2010.]. (in Russian)
3. Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. Bisphenol A Exposure during Adulthood Alters Expression of Aromatase and 5 α -Reductase Isozymes in Rat Prostate. Nadal A, editor. PLoS ONE. 2013 Feb 6;8(2):e55905. doi: 10.1371/journal.pone.0055905
4. El-Beshbishy HA, Aly HAA, El-Shafey M. Lipic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. Toxicology and Industrial Health. 2012 May 23;29(10):875–87. doi: 10.1177/0748233712446728
5. Geens T, Neels H, Covaci A. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. Chemosphere. 2012 May;87(7):796–802. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.002

6. Hond ED, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, et al. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environment International*. 2015 Nov;84:154–60. doi: 10.1016/j.envint.2015.07.017
7. Ansoumane K, Duan P, Quan C, Yaima MLT, Liu C, Wang C, et al. Bisphenol A induced reactive oxygen species (ROS) in the liver and affect epididymal semen quality in adults Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2014 May 31;6(4):103–12. doi: 10.5897/jtehs2014.0309
8. Lan Z, Hyung Kim T, Shun Bi K, Hui Chen X, Sik Kim H. Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the epididymis and shows sperm toxicity in male sprague-dawley rats. *Environmental Toxicology*. 2013 Aug 9;30(1):83–91. doi: 10.1002/tox.21897
9. Li X, Ying G-G, Zhao J-L, Chen Z-F, Lai H-J, Su H-C. 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment International*. 2013 Feb;52:81–6. doi: 10.1016/j.envint.2011.03.026
10. Liu C, Duan W, Li R, Xu S, Zhang L, Chen C, et al. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death & Disease*. 2013 Jun;4(6):e676–e676. doi: 10.1038/cddis.2013.203
11. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, et al. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology Letters*. 2010 Apr 15;194(1–2):16–25. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.02.002
12. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology male reproductive health and dysfunction*. Berlin (Alemania) Springer; 2010.
13. Pernoncini KV, Montagnini BG, de Góes MLM, Garcia PC, Gerardin DCC. Evaluation of reproductive toxicity in rats treated with triclosan. *Reproductive Toxicology*. 2018 Jan;75:65–72. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.11.010
14. Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environment International*. 2012 Nov;48:78–83. doi: 10.1016/j.envint.2012.07.003
15. Qiu L-L, Wang X, Zhang X, Zhang Z, Gu J, Liu L, et al. Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicology Letters*. 2013 May;219(2):116–24. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.03.011
16. Tiwari D, Vanage G. Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reproductive Toxicology*. 2013 Sep;40:60–8. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.05.013
17. Wisniewski P, Romano RM, Kizys MML, Oliveira KC, Kasamatsu T, Giannocco G, et al. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology*. 2015 Mar;329:1–9. doi: 10.1016/j.tox.2015.01.002
18. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975 Nov 1;72(11):4425–9. doi: 10.1073/pnas.72.11.4425

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

Принята в печать 27.02.2019

Accepted 27.02.2019

Для цитирования: Чигринцев С.В., Брюхин Г.В., Завьялов С.Н. Морфофункциональное состояние репродуктивной системы самцов белых крыс при воздействии бисфенола А и триклозана. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2019; 8(1): 77–81. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-77-81.

For citation: Chigrinets SV, Bryukhin GV, Zav'yalov SN. Morphofunctional characteristics of the male reproductive system of white rats treated with bisphenol A and triclosan. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2019; 8(1): 77–81. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-77-81.