

УДК 611.013.12:613.292-092.9

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ МЫШЕЙ ПРИ КОРМЛЕНИИ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКОЙ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ

Масленникова Л.А., Божко Г.Г.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», Владивосток, Россия

Изучали влияние пищевой добавки из кукумарии «ТИНГОЛ-1» (гидролизат из мышечной ткани, содержащий 250 мкг/мл тритерпеновых гликозидов) на семенники, селезенку и печень беспородных мышей-самцов. Экспериментальные животные получали полный рацион, к которому в течение полутора месяцев добавляли «ТИНГОЛ-1» (1,5 мл/кг; 3 мл/кг). Контрольные животные получали обычный корм. Состояние семенников, селезенки и печени оценивали макроскопически, а семенников морфометрически на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином. Анализ микропрепаратов семенников показал возрастание митотической активности сперматогоний у животных после кормления «ТИНГОЛ-1», достоверное увеличение количества семенных канальцев со сперматидами 11-12 этапов, что свидетельствует о стимуляции спермиогенеза мышей пищевой добавкой «ТИНГОЛ-1».

**Ключевые слова:** гаметогенез, сперматогенез, спермиогенез, кукумария

## MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SPERMATOGENOUS EPITHELIUM OF MICE BY THE FOOD ADDITIVES FROM THE MARINE HYDROBIONTES

Maslennikova L.A., Bozhko G.G.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia  
e-mail: biologiavgmu@mail.ru*

Influence by the food additives from *Cucumaria japonica* "TINGOL-1" (hydrolysate from muscular tissue containing 250 µg/ml of triterpene glycosides) on testicles, spleen and liver of males of mice was studied. The experimental animals received complete ration, by which during 1,5 months "TINGOL-1" (1,5 ml/kg; 3 ml/kg) was added. The control animals received a usual forage. A condition of testicles, spleen and liver was estimated macroscopically, and also on paraffin microscopic sections, painted by hematoxylin. The analysis of micropreparations from testicles has shown increase mytotic activity of animals after feeding with "TINGOL-1" authentic increase of quantity of canals with spermatides of 11-12 stages of spermiogenesis, that testifies about stimulation of spermiogenesis of mice by the food additives "TINGOL-1".

**Keywords:** gametogenesis, spermatogenesis, spermiogenesis, cucumaria

Богатство и разнообразие химического состава кукумарии определяет возможность действия ее на ткани с высокой степенью регенерации. Таким свойством обладает сперматогенный эпителий семенников млекопитающих. В процессе сперматогенеза формируется зрелый сперматозоид – клетка с инактивированным геномом. С другой стороны, малодифференцированные, постоянно делящиеся клетки сперматогенного эпителия – наиболее ранимы при действии мутагенных факторов эндогенной природы. В связи с этим, пищевые добавки, содержащие антиоксидантные вещества, набор жирорастворимых витаминов и глюкозидов может оказывать важное стабилизирующее действие на клетки сперматогенного эпителия. В настоящее время широко изучается влияние экстрактов из кукумарии на гаметогенез [2, 3].

Цель исследования – определить биологическую эффективность и степень влияния мышечного гидролизата кукумарии на разные стадии сперматогенеза.

Задачей настоящего исследования было изучение спермиогенеза и митотической активности сперматогоний после приема препарата ТИНГОЛ-1 (гидролизат кукумарии), которые разработаны ТИПРО-центром.

### Материалы и методы

В работе использовали материал, полученный от 50 половозрелых нелинейных самцов мышей шести месячного возраста с исходной массой около 28 г.

Все животные с момента рождения содержались в стандартных условиях вивария, животных кормили 1 раз в сутки в утренние часы.

Самцов мышей разделили на три групп по 10 животных, которые в течение 6 недель были в эксперименте. Первая группа – (контрольная) получила нормативную пищевую смесь; вторая группа – ТИНГОЛ-1 в виде одной ежедневной индивидуальной добавки к основному корму по 1,5 мл на кг массы тела; третья группа – ТИНГОЛ-1 в виде одной ежедневной индивидуальной добавки к основному корму по 3 мл/кг.

ТИНГОЛ-1 представляет собой гидролизат мышечной ткани кукумарии, содержащей 250 мкг/мл тритерпеновых гликозидов [7].

В течение всего периода проведения эксперимента, животные содержались при обычном световом и температурном режимах, осуществлялось наблюдение

за состоянием и поведением животных. Через 1,5 месяца всех животных забивали методом декапитации.

В работе использовали морфологические и морфометрические методы. Для проведения морфологических исследований, кусочки семенников (около 0,5 см<sup>3</sup>) фиксировали в жидкости Буэна. После продолжительного обезвоживания в спиртах возрастающей крепости, материал заливали в парафин. На санном микротоме готовили срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином с эозином. При морфометрическом исследовании на серийных парафиновых срезах семенных канальцев просчитывали количество митотических сперматогоний на 1000 сперматогоний разной генерации.

Коэффициент митотической активности определяли классически: как процент сперматогоний на стадиях митоза от общего количества просчитанных сперматогоний. Об активности спермиогенеза судили по соотношению разных стадий сперматид в семенных канальцах. Подсчитывали количество семенных канальцев со сперматидами 1-11 этапов спермиогенеза, количество семенных канальцев со сперматидами 12 этапа и далее по классификации Рузен – Ранга, 1962 г. [9]. Статистический анализ и обработку результатов экспериментальных исследований проводили методами вариационной статистики с определением достоверности различий по критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Динамика массы тела и анатомические параметры животных в 6-недельном эксперименте характерны для выявления физиологического состояния патогенез или норма. Изменение массы тела и массы таких органов как семенники, печень, селезенка очень показательны. По этим параметрам можно уловить те или иные нарушения, когда внешние проявления патологии или токсического воздействия компонентов питания не удается обнаружить. Для большей степени достоверности подопытные животные, получавшие добавку ТИНГОЛ-1 и контрольные, получавшие обычный рацион, были одного возраста, примерно одного веса и находились в равных условиях содержания.

Наблюдения за динамикой массы тела животных, семенников, селезенки и печени показали, что прирост по этим параметрам в опытных группах не отличается от контроля (критерий Вильсона) (табл. 1).

**Таблица 1**

Морфологические показатели органов мыши после кормления пищевой добавкой

Условия эксперимента	Вес мыши, г M±m	Вес семенника, г M±m	Вес печени, г M±m	Вес селезенки, г M±m
1 группа	28,3±2,1	0,200±0,015	1,450±0,21	0,200±0,03
2 группа	27,9±2,7	0,190±0,021	1,500±0,28	0,220±0,07
3 группа	28,0±2,4	0,220±0,028	1,460±0,25	0,210±0,05

При вскрытии опытных животных внутренние органы не обнаруживали отклонений от нормы. Включение в рацион мышей-самцов «ТИНГОЛ-1» не оказывало изменений в поведении животных по сравнению с контрольной группой; не зарегистрировано каких-либо сдвигов показателей летальности.

Гистологическое исследование половых желез у всех животных не выявило морфологических отклонений от нормы. Стенки семенных трубочек четко выявляются на гистологических срезах. Пристеночно во всех семенных канальцах можно видеть как сперматогонии типа А, так и сперматогонии других генераций. В семенных канальцах, как опытных животных, так и контрольных, половые клетки располагаются концентрическими рядами в соответствии со стадиями сперматогенного цикла.

Цитологический анализ семенников мышей, в рацион которых был включен ТИНГОЛ-1, показал достоверное увеличение доли митотических ядер сперматогоний по отношению к интерфазным спер-

матогониям (табл. 2). Однако величина митотического индекса не имела достоверного отличия между опытными группами животных, получавших разные концентрации ТИНГОЛ-1.

Анализ спермиогенеза мышей третьей группы, в рацион которых был включен ТИНГОЛ-1 по 3 мл/кг в сутки, выявил по сравнению с контрольными животными достоверное уменьшение количества семенных канальцев со сперматидами до 12 этапа, увеличение количества канальцев со сперматидами на 12 этапе и далее (табл. 2).

Репродуктивная система является наиболее лабильной и, следовательно, восприимчивой к действию поступающих в организм веществ. Сперматогенез – уникальная модель для оценки состояния организма, а модификации в семенных канальцах – важнейшей составляющей ответной реакции на любое воздействие. В процессе созревания мужских гамет последовательно происходят три интересных процесса. Первый – сперматоцитогенез, когда происходит пролиферация сперматогониев (деление митозом) с об-

разованием ряда генераций, при этом каждая последующая генерация более дифференцирована, чем предыдущая. Второй – мейоз: кроссинговер, обмен генными локусами, два деления созревания, ведущие к уменьше-

нию вдвое числа хромосом в развивающихся половых клетках. Третий – спермиогенез, в ходе которого сперматиды подвергаются цитологическим трансформациям, приводящим к образованию сперматозоида.

**Таблица 2**

Митотический индекс и количественное соотношение семенных канальцев мышей со сперматидами разной степени зрелости после кормления пищевой добавкой

Условия эксперимента	Митотический индекс (%) M ± m	Количество семенных канальцев со сперматидами до 12 этапа M ± m	Количество семенных канальцев со сперматидами на 12 этапе и далее M ± m
1 группа	11,6±0,81	95±5,8	33±3,1
2 группа	19,2±0,71	81±4,3	49±5,2
3 группа	20,7±0,9	73±3,8	53±4,3

Вероятно, ТИНГОЛ-1 опосредовано через ряд систем активизировал митотическое деление сперматогоний. В митотическом цикле любой клетки есть две точки (на стадии  $g_1$  и  $g_2$ ), включив которые, можно заставить клетку делиться [1]; поиск этих веществ не прекращается. В настоящее время описано несколько препаратов такого порядка, которые получены из беспозвоночных, например, активатор роста, выделенный из гидры [10]. Он не только активизирует пролиферацию клеток, но и ускоряет половое созревание самок крыс [4] и самцов моллюсков [5]. Это, как правило, нейропептиды. На клеточной стенке сперматогонии разных генераций обнаружены рецепторы для тестостерона и дигидротестостерона [8]. Присоединение гормона к этим рецепторам активизирует ядерный обмен и в развивающихся половых клетках. Регуляция секреции тестостерона производится другими гормонами, которые вырабатываются как клетками передней доли гипофиза, так и клетками семенника. На фоне приема ТИНГОЛ-1, отмечается ускорение спермиогенеза мышей. В настоящее время есть две гипотезы регуляции спермиогенеза. Первая предполагает, что включается пролиферация сперматогоний, которая активизирует последующие все стадии. Суть второй гипотезы в том, что есть две основные точки регуляции спермиогенеза: 1 – активация пролиферации сперматогоний; 2 – вступление в мейоз, за которым последовательно идет дифференцировка сперматид в сперматозоиды.

Предварительное введение мышам трипептидов гликозидов (в кукумаридо-

зах) способствует восстановлению клеточной популяции тимуса и селезенки у животных после 24-часового иммобилизационного стресса [6]. Механизмы такого противоположного действия неясны. Однако, из проведенных исследований ясно, что ТИНГОЛ-1 стимулируют последние стадии спермиогенеза мыши и активизирует пролиферацию сперматогоний.

**Список литературы**

1. Гурин И.С., Амчихин П.С. Биологически активные вещества гидробионтов – источник новых лекарств и препаратов. М.: Наука, 1981. 201 с.
2. Зенкина В.Г., Каредина В.С., Солодкова О.А. Морфология яичников андрогенизированных крыс на фоне приема экстракта из кукумарии // ТМЖ. 2007. № 4. С. 70-72.
3. Каредина В.С., Зенкина В.Г. Действие пищевых добавок «Тингол-1» и «Тингол-2» на яичники крыс // ТМЖ. 2003. № 4 (14). С. 35-36.
4. Кривошеев С.Г., Дегтярь В.Г., Четверикова М.Н. Пептидный «морфоген гидра» ускоряет половое созревание крыс // Нейропептиды, их роль в физиологии и патологии. 1985. С. 142-143.
5. Масленникова Л.А. Влияние пептидного «морфогена» гидры на сперматогенез приморского гребешка // Известия ТИНРО. Владивосток. 2000. № 127. С. 108-112.
6. Преображенский А.Б., Рубцов Б.В., Жарова Л.В. Исследование адаптогенных свойств кукумаризолида при выживании мышей в экстремальных условиях // Биологически активные вещества гидробионтов – новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты: материалы Всесоюз. совещания. Владивосток, 1991. С. 96.
7. Тимчишина Г.Н., Чумак А.Д., Павел К.Г. Использование кукумарии для производства лечебно-профилактических продуктов // Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок: сб. Владивосток, 1999. С. 100-103.
8. Connell C.J., Connell G.M. The interstitial tissue of the testis // The Testis Ed. A.D. Johnson, W.R. Qomes // N.J. Z.: Acad. Press. 1987. Vol. 4. P. 333-370.
9. Roosen-Runge E.C. The pores of sperm atogenesis in animalis // Biol. Revs. 1962. Vol. 37. P. 343-377.
10. Schaller H.C. Neuropeptides in hydra // Trends Neurosci. 1979. Vol. 2. P. 120-122.