УДК 611.013.12:613.292-092.9

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ МЫШЕЙ ПРИ КОРМЛЕНИИ СПИРТОВЫМ ЭКСТРАКТОМ ИЗ КУКУМАРИИ ЯПОНСКОЙ

Масленникова Л.А., Божко Г.Г.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, e-mail: biologiavgmu@mail.ru

Исследовали действие «ТИНГОЛ-2» (спиртового раствора внутренностей кукумарии, содержащего 650 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–2» (0,01; 0,03 мл/кг). Контрольные животные получали полный рацион без добавок. Состояние семенников, селезенки и печени оценивали макроскопически. Цитологию семенников исследовали морфометрически на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином. Коэффициент митотической активности сперматогониев определяли как процент митотических гониев от общего количества сперматогониев. Об активности спермиогенеза судили по соотношению разных стадий сперматид в семенных канальцах. Подсчитывали количество семенных канальцев, которые имели сперматиды с 1 по 11 этап (первая группа) и сперматиды 12 этапа и далее (вторая группа) по классификации Рузен – Ранга. Наблюдения за динамикой массы тела животного, семенника, селезенки и печени показывают, что прирост по этим параметрам в опытных группах не отличается от контроля (критерий Вильсона). Анализ микропрепаратов семенников показывает возрастание митотической активности сперматогониев у животных опытных групп после кормления «ТИНГОЛ–2». В результате микроскопического анализа семенников подопытных мышей отмечается достоверное увеличение количества семенных канальцев со сперматидами 11–12 этапов, что свидетельствует о стимуляции спермиогенеза мышей пищевой добавкой «ТИНГОЛ-2». Данные исследования могут заинтересовать врачей-андрологов.

Ключевые слова: гаметогенез, сперматогенез, спермиогенез, кукумария

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SPERMATOGENOUS EPITHELIUM OF MICE BY THE FOOD SPIRIT EXTRACT FROM CUCUMARIA JAPONICA

Maslennikova L.A., Bozhko G.G.

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

Influence by the food additives from Cucumaria japonica «TINGOL-2» (spirit extract, containing 650 ug/ml of triterpene glycosides) on testicles, spleen and liver of males of mongrel mice was studied. The experimental animals received complete ration, by which during 1,5 months «TINGOL-2» (0,01; 0,03 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 gematoxin. The coefficient of metotic activity spermiogenesis was defined as percent metotic gonee from total spermagonee. The ration of the different stages of spermatids in the canalize characterizes the activity of spermatogenesis. Activity of different stages of spermatids in a seed canalis which had spermatids with 1 on 11 stages (the first group) and spermatids of the 12th stage and further (the second group) on classification of Roozen-Range. Overseeing by dynamics of body weight of animal, a spermary, a spleen and liver shows that the increase in these parameters in experienced group does not different from monitoring (criterion of Wilson). The analysis of micropreparations from testicles has shown increase mytotic activity of animals after feeding with «TINGOL-2». As a result of the microscopic analysis of spermaries of experimental mice the reliable increase in quantity of a seed canalize with spermatids of 11–12 stages that testifies to stimulation of a spermatogenesis of mice a food additive of «TINGOL-2» is noted. These studies may be of interest to andrologists doctors.

Keywords: gametogenesis, spermatogenesis, spermiogenesis, cucumaria

Особенность 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, могут оказывать важное стабилизирующее действие на клетки сперматогенного эпителия. При этом важно знать, на какие стадии сперматогенеза оказывают влияние морские гидробионты, как идут процессы митоза сперматогониев, как идут процессы дифференцировки сперматид и сперматозоидов. Необходима наиболее полная информация о влиянии на разные стадии сперматогенеза препаратов из кукумарии, приготовленных на спирту. В последнее время широко

исследуется действие экстрактов из кукумарии на гаметогенез [3].

Цель исследования – определить степень влияния спиртового раствора внутренностей кукумарии японской на сперматогенез.

Задачей настоящего исследования было изучение сперматогенеза и митотической активности сперматогониев после приема препарата ТИНГОЛ-2 (спиртовой раствор внутренностей кукумарии японской), которые разработаны ТИНРО-центром.

Материалы и методы исследования

В исследовании использовали материал, полученный от 50 половозрелых нелинейных самцов мышей шестимесячного возраста с исходной массой около 28 г.

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

Самцы мышей были разделены на три группы (по 10 животных). Первая группа – контрольная, которая в течение шести недель получала нормативную пищевую смесь; вторая группа – ТИНГОЛ-2 в виде одной ежедневной индивидуальной добавки к основному корму по 0,01 мл/кг; третья группа – ТИНГОЛ-2 в виде одной ежедневной индивидуальной добавки к основному корму по 0,03 мл/кг.

ТИНГОЛ-2 – спиртовой экстракт внутренностей кукумарии, обогащенный тритерпеновыми гликозидами (650 мкг/мл) [8].

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^3) 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 сперматогониев на 1000 сперматогониев разной генерации.

Коэффициент митотической активности определяли классически: как процент сперматогониев на стадиях митоза от общего количества просчитанных сперматогониев. Об активности спермиогенеза судили по соотношению разных стадий сперматид в семенных канальцах. Подсчитывали количество семенных канальцев со сперматидами с 1 по 11 этапы и сперматидами 12 этапа и далее (классификация по Рузен – Рангу, 1962 г) [10]. Статистический анализ и обработку результатов экспериментальных исследований проводили методами вариационной статистики с определением достоверности различий по критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Динамика массы тела и анатомические параметры животных в 6-недельном эксперименте очень показательны для выявления патогенеза или нормального физиологического состояния. Изменение массы тела и соотносительные 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 компонента питания обнаружить не удается. Для большей степени достоверности данного показателя подопытные животные, получавшие добавку ТИНГОЛ-2, и контрольные, получавшие обычный рацион, были одного возраста, примерно одного веса и находились в равных условиях содержания.

Наблюдения за динамикой массы тела животного, семенника, 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)	Вес семенника (г)	Вес печени (г)	Вес селезенки (г)
	M ± m	M ± m	M ± m	M ± m
1 группа	28,3 ± 2,1	0,200 ± 0,015	1,450 ± 0,21	0,200 ± 0,03
2 группа	28,5 ± 2,5	0,210 ± 0,19	1,550 ± 0,29	0,220 ± 0,05
3 группа	27,9 ± 3,0	0,190 ± 0,024	1,500 ± 0,3	0,210 ± 0,04

При вскрытии опытных животных внутренние органы не обнаруживали отклонений от нормы.

Включение в рацион мышей-самцов «ТИНГОЛ-2» не вызывало 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 отклонений от нормы в морфологии яичек. Стенки семенных трубочек четко выявляются на гистологических срезах. Пристеночно во всех семенных канальцах можно видеть сперматогонии типа А и, в зависимости от стадии, сперматогонии других генераций.

В семенных канальцах как опытных животных, так и контрольных половые клетки располагаются концентрическими рядами в соответствии со стадиями сперматогенного цикла.

Таблица 2

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

Условия эксперимента	Митотический индекс (%)	Количество семенных канальцев со сперматидами до 12 этапа	Количество семенных канальцев со сперматидами на 12 этапе и далее
	M ± m	M ± m	M ± m
1 группа	11,6 ± 0,81	95 ± 5,8	33 ± 3,1
2 группа	12,8 ± 0,71	87 ± 4,1	41 ± 3,5
3 группа	14,1 ± 0,9	72 ± 5,1	47 ± 4,1

Цитологический анализ семенников мышей, получавших ТИНГОЛ-2, выявил увеличение количества митотических сперматогониев по отношению к контрольным животным. Митотический индекс во второй и особенно в третьей опытных группах несколько выше этого показателя у контрольных мышей (табл. 2).

Анализ спермиогенеза в семенных канальцах мышей, в рацион которых был включен ТИНГОЛ-2, выявил у обеих групп мышей по сравнению с контрольными животными увеличение количества семенных канальцев со сперматидами на 12 этапе спермиогенеза и далее. Количество семенных канальцев мышей, не имеющих сперматид на 12 этапе спермиогенеза, меньше по отношению к контрольной группе (табл. 2).

Репродуктивная система является наиболее лабильной и, следовательно, восприимчивой к действию поступающих в организм веществ. Сперматогенез может быть уникальной моделью для оценки состояния организма, а модификации в семенных канальцах – важнейшей составляющей ответной реакции на любое воздействие. Исследование семенников опытных животных, получавших ТИНГОЛ-2, выявило увеличение количества митотически делящихся сперматогониев. Вероятно, эта пищевая добавка опосредованно, через ряд систем, активизировала митотическое деление. Известно, что в митотическом цикле любой клетки есть две точки (стадии G_1 и G_2), включив которые, можно заставить клетку делиться [2]. 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 [6]. Это, как правило, нейропептиды.

У самцов экспериментальных групп мышей, в рацион которых была включена пищевая добавка ТИНГОЛ-2, отмечено увеличение количества семенных канальцев со сперматидами на завершающемся этапе сперматогенеза; что свидетельствует об ускорении спермиогенеза. ТИНГОЛ-2 – это пищевая добавка из кукумарии, в которой активным началом являются тритерпеновые гликозиды [8]. Обнаруженные в тканях дальневосточного трепанга тритерпеновые гликозиды обладают весьма высокой биологической активностью. Отмечается, что тритерпеновые гликозиды ингибируют синтез белка в культуре клеток костного мозга крыс. Шимид [11] и Анисимов [1] описали антигрибковую активность тритерпеновых гликозидов (при концентрации 25 мкг/мл). Предварительное введение мышам тритерпеновых гликозидов (в кукумаридозах) способствует восстановлению клеточной популяции тимуса и селезенки у животных после 24-часового иммобилизационного стресса [7]. Механизмы такого разнообразного действия неясны. Однако на основании проведенных исследований можно предположить, что ТИНГОЛ-2 стимулирует спермиогенез мыши, активизирует пролиферацию сперматогониев. Подобные данные были получены при кормлении мышей гидролизатом мышечной ткани кукумарии японской [5].

Список литературы

1. Анисимов М.М., Шеглов В.В., Стоник В.А. Сравнительное изучение антигрибковой активности тритерпеновых гликозидов тихоокеанских голотурий // ДАН СССР, – 1972. – т. 207. – Вып. 3. С. 711–713.

2. Гурин И.С., Амчихин П.С. Биологически активные вещества гидробионтов – источник новых лекарств и препаратов. – М.: Наука, 1981. – 201 с.

3. 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.

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., Божко Г.Г. Морфологическая характеристика сперматогенного эпителия мышей при кормлении пищевой добавкой из морских гидробионтов // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 9 (часть 1). – С. 47–49.

6. Масленникова Л.А. Влияние пептидного «морфогена» гидры на сперматогенез приморского гребешка // Известия ТИНРО. Владивосток. – 2000. – № 127. – С. 108–112.

7. Преображенский А.Б., Рубцов Б.В., Жарова Л.В. Исследование адаптогенных свойств кукумариозида при выживании мышей в экстремальных условиях // Биологически активные вещества гидробионтов – новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты: всесоюзное совещание. – Владивосток, 1991. – С. 96.

8. Тимчишина Г.Н., Чумак А.Д., Павел К.Г. Использование кукумарии для производства лечебно–профилактических продуктов // Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок. – Владивосток. – 1999. – С. 100–103.

9. Roosen–Runge E.C. The poress of sperm atogemsis 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.

11. Schimida S. Antifungal steroid glicoside from sea cucumber // Science. – 1969. – Vol. 163. – P. 1462.

References

1. Anisimov M.M., Sheglov V.V., Stonik V.A. Sravnitelnoe izuchenie antigribkovoj aktivnosti triterpenovyh glikozidov tihookeanskih goloturij. DAN SSSR, 1972, t.207, no 3, pp. 711–713.

2. Gurin I.S., Amchihin P.S. Biologicheski aktivnye veshhestva gidrobiontov istochnik novyh lekarstv i preparatov. M.: Nauka, 1981, pp. 201.

3. Zenkina V.G., Karedina V.S., Solodkova O.A. Morfologija jaichnikov androgenizirovannyh krys na fone priema jekstrakta iz kukumarii. TMZh, 2007, no 4, pp. 70–72.

4. Krivosheev S.G., Degtjar V.G., Chetverikova M.N. Peptidnyj «morfogen gidra» uskorjaet polovoe sozrevanie krys. Nejropeptidy, ih rol v fiziologii i patologii, 1985, pp. 142–143.

5. Maslennikova L.A., Bozhko G.G. Morfologicheskaja harakteristika spermatogennogo jepitelija myshej pri kormlenii pishhevoj dobavkoj iz morskih gidrobiontov. Uspehi sovremennogo estestvoznanija, 2014, no 9 (chast 1), pp. 47–49.

6. Maslennikova L.A. Vlijanie peptidnogo «morfogena» gidry na spermatogenez primorskogo grebeshka. Izvestija TINRO, Vladivostok, 2000, no 127. pp. 108–112.

7. Preobrazhenskij A.B., Rubcov B.V., Zharova L.V. Issledovanie adaptogennyh svojstv kukumariozida pri vyzhivanii myshej v jekstremalnyh uslovijah. Sb.: Vsesojuznoe soveshhanie «Biologicheski aktivnye veshhestva gidrobiontov novye lekarstvennye, lechebno–profilakticheskie i tehnicheskie preparaty», Vladivostok, 1991, pp. 96.

8. Timchishina G.N., Chumak A.D., Pavel K.G. Ispolzovanie kukumarii dlja proizvodstva lechebno–profilakticheskih produktov. Sb.: Novye biomedicinskie tehnologii s ispolzovaniem biologicheski aktivnyh dobavok, Vladivostok, 1999, pp. 100–103.

9. Roosen–Runge E.C. The poress of sperm atogemsis in animalis. Biol. Revs., 1962, no. 37, pp. 343–377.

10. Schaller H.C. Neuropeptides in hydra. Trends Neurosci, 1979, no. 2, pp. 120–122.

11. Schimida S. Antifungal steroid glicoside from sea cucumber. Science, 1969, no. 163, pp. 1462.

Рецензенты:

Матвеева Н.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток;

Маркина Л.Д., д.м.н., профессор кафедры физиологии человека, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства» здравоохранения РФ, г. Владивосток.