

Иванова Вера Владимировна

Влияние больших слюнных желёз крыс на морфофункциональное состояние
семенников в эксперименте

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск - 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Мильто Иван Васильевич

Официальные оппоненты:

д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России

Шевлюк Николай Николаевич

д-р биол. наук, профессор, руководитель группы микроскопических исследований ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Рябчикова Елена Ивановна

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет».

Защита состоится «____» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Большие слюнные железы (БСЖ) млекопитающих (околоушные, поднижнечелюстные и подъязычные) участвуют в начальных этапах пищеварения, периодической деятельности желудочно-кишечного тракта, репарации и антимикробной защите кожи и слизистой оболочки полости рта, а также в минерализации костей и зубов [Stern L.E. et al., 2000; Pedersen A.M. et al., 2002; Коноваленко Ю.А., 2004; Dodds M.W. et al., 2005; Mori M. et al., 2008]. В БСЖ грызунов, помимо выработки пищеварительных ферментов и муцинов, осуществляется синтез паротина, сиалорфина, эпидермального фактора роста (ЭФР), фактора роста нервов (ФРН), основного фактора роста фибробластов, фактора роста эндотелия сосудов, трансформирующего фактора роста α и β , фактора роста гепатоцитов, инсулина и инсулин-подобных факторов роста, глюкагона, калликреина, ренина и других биологически активных веществ (БАВ) [Сукманский О.И., 1991; Amano O. et al., 2005], обладающих эндо- и паракринным действием [Barka T., 1980; Rougeot C. et al., 2000; Mathison R., 2009]. Непищеварительные функции БСЖ изучены недостаточно и привлекают к себе внимание широкого круга исследователей.

В 1940 г. был описан феномен структурного полового диморфизма поднижнечелюстных слюнных желез мышей, что позволило предположить наличие тесной взаимосвязи между БСЖ и органами репродуктивной системы грызунов [Lacassagne A. et al., 1940]. В настоящее время не вызывает сомнения наличие морфологического и биохимического полового диморфизма в БСЖ мышей, крыс, хомяков, песчанок и свиней [Booth W.D. et al., 1973; Pinkstaff C.A., 1998; Miyaji Y. et al., 2008; Wu J.F. et al., 2014]. Вследствие этого, влияние БСЖ на структуру и функционирование органов репродуктивной системы самцов является предметом научных исследований, а выявление его механизмов является важной фундаментальной задачей.

Накоплены сведения и о взаимосвязи БСЖ и репродуктивной системы человека [Амерханов М.В., 2002]. Так, у мужчин на фоне гипогонадизма выявляется

сиалоаденоз, сопровождающийся снижением саливации [Степаненко Р.С., 2014]. Следует отметить, что при ряде заболеваний БСЖ и челюстно-лицевых травмах производится частичная или полная сиалоаденэктомия, влияние которой на мужскую репродуктивную систему недостаточно изучено. Кроме того, расширение представлений о взаимосвязи слюнных и мужских половых желёз, позволит применять БАВ слюнных желёз для профилактики и лечения мужского бесплодия, разработки новых методов контрацепции и др. [Lee N.P. et al., 2004].

Степень разработанности. Удаление БСЖ грызунов приводит к изменениям со стороны органов репродуктивной системы самцов, однако, сведения об эффектах факторов слюнных желёз на семенники зачастую противоречивы [Бабаева А.Г. и др, 1979; Tsutsumi O.A. et al., 1986; Сукманский О.И., 1991; Abe K. et al., 2008; Makarevich A.V. et al., 2010; Vodare R.D. et al., 2013; Tamada H. et al., 2016;]. Преобладающее число работ направлено на изучение эффектов сиалоаденэктомии на органы репродуктивной системы грызунов [Tsutsumi O.A. et al., 1986; Wong R.W. et al., 2000; Vhopale L.P. 2011 et al.; Vodare R.D. et al., 2013], тогда как влиянию гипертрофии БСЖ на морфофункциональное состояние семенников в эксперименте уделено незначительное внимание [Бабаева А.Г. и др., 1977]. Несмотря на многолетнее экспериментальное исследование влияния БСЖ грызунов на репродуктивную систему, конкретные механизмы их воздействия и обуславливающие его БАВ, остаются неясными [Yang T. et al., 2013; Zhang S. et al., 2013].

Известно, что биологически активные факторы слюнных желёз, в частности ЭФР, оказывают влияние на развитие органов репродуктивной системы крыс в пренатальном периоде [Vodare R.D. et al., 2013], тогда как последствия удаления или гипертрофии БСЖ на становление структуры и функции семенников в постнатальном онтогенезе изучены недостаточно. Работа призвана установить морфофункциональные особенности семенников крыс на фоне гипертрофии и удаления БСЖ в динамике.

Цель исследования. Изучить влияние гипертрофии больших слюнных желёз и тотальной сиалоаденэктомии на морфофункциональное состояние семенников у крыс.

Задачи исследования:

1. Установить морфофункциональные особенности семенников неполовозрелых крыс через 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 недель при гипертрофии больших слюнных желёз, вызванной многократной ампутацией резцов.

2. Изучить морфофункциональное состояние семенников половозрелых крыс через 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 недель при гипертрофии больших слюнных желёз, вызванной многократной ампутацией резцов.

3. Выявить влияние тотальной сиалоаденэктомии на морфофункциональное состояние семенников неполовозрелых крыс через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 недель после операции.

4. Охарактеризовать влияние тотальной сиалоаденэктомии на морфофункциональное состояние семенников половозрелых крыс через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 недель после операции.

Научная новизна. Впервые проведен комплексный анализ влияния тотальной сиалоаденэктомии на развитие семенников и сперматогенез в постнатальном периоде (с 20 суток после рождения) у крыс. Впервые изучены эффекты гипертрофии БСЖ на морфофункциональное состояние семенников крыс в отдаленные сроки (10-12 недель после формирования гипертрофии). Иммуногистохимическим методом впервые показано изменение количества позитивных по рецептору ЭФР (РЭФР) клеток в семенниках крыс в результате тотальной сиалоаденэктомии или гипертрофии БСЖ. Впервые проведено ультраструктурное исследование клеток семенников крыс при моделировании гипертрофии БСЖ. Продемонстрировано, что эндокринные факторы БСЖ участвуют в становлении сперматогенной и стероидогенной функции семенников крыс.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые данные фундаментального характера, раскрывающие структурные аспекты взаимного влияния БСЖ и органов репродуктивной системы грызунов. Продемонстрировано, что смоделированная многократной ампутацией резцов гипертрофия БСЖ и тотальная сиалоаденэктомия вызывают однонаправленные изменения морфофункционального состояния семенников неполовозрелых и половозрелых крыс, которые полностью нивелируются к концу эксперимента. Настоящее исследование подтверждает роль ЭФР поднижнечелюстных слюнных желёз в становлении сперматогенной и стероидогенной функции семенников крыс. Установление механизмов взаимодействия между БСЖ и семенниками неполовозрелых и половозрелых крыс вносит вклад в развитие современной экспериментальной биологии. В то же время полученные сведения могут найти приложение в диагностике и терапии заболеваний мужской репродуктивной системы человека.

Методология и методы исследования. Многоуровневый подход к изучению проблемы, дизайн эксперимента и достаточная выборка экспериментальных животных призваны обеспечить достижение поставленных задач. Набор использованных методов позволяет получить результаты, отвечающие цели и задачам исследования. В работе был использован комплекс гистологических и морфометрических методов, выполнены иммуногистохимическое и ультраструктурное исследования, а также проведен статистический анализ количественных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Многократная ампутация резцов вызывает у неполовозрелых и половозрелых крыс гипертрофию исключительно поднижнечелюстных желёз. Гипертрофия поднижнечелюстных желёз заключается в увеличении площади ацинусов, тогда как удельный объем клеток внутридольковых протоков снижается.

2. Многократная ампутация резцов и тотальная сиалоаденэктомия вызывают схожие и обратимые морфологические изменения в семенниках неполовозрелых и половозрелых крыс.
3. Клетками-мишенями ЭФР в семенниках неполовозрелых и половозрелых крыс, подвергшихся многократной ампутации резцов и тотальной сиалоаденэктомии, являются сперматогонии и поздние сперматиды.
4. У неполовозрелых и половозрелых животных в результате многократной ампутации резцов или тотальной сиалоаденэктомии наблюдаются переходящие ультраструктурные изменения sustentocитов и сперматогенных клеток.
5. Многократная ампутация резцов и тотальная сиалоаденэктомия приводят к замедлению становления функциональной активности клеток Лейдига у неполовозрелых крыс и её угнетению у половозрелых крыс.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на XIII конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016), I международной морфологической научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины» (Новосибирск, 2016), IV международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, 2016), XVIII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины» (Владивосток, 2017), XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017), Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017), Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека» (Оренбург, 2017), II международной

морфологической научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины» (Новосибирск, 2017), Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2018).

Внедрение результатов. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, 8 из них в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста, состоит из введения, четырёх глав («Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов собственных исследований»), выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 284 источника, из которых 40 отечественных и 244 зарубежных. Работа иллюстрирована 61 рисунком, 30 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовано 380 беспородных крыс-самцов, которые разделены на две группы: 1-я группа (190 животных) – неполовозрелые (20 дней, 45 ± 10 г); 2-я группа (190 животных) – половозрелые (60 дней, 150 ± 20 г). В каждой из указанных групп выделяли: интактных – 40 крыс (ИН1 и ИН2, соответственно), животных, которые подвергались наркотизации (контрольные) – 35 крыс (К1 и К2, соответственно), животных с многократной ампутацией резцов – 35 крыс (АР1 и АР2, соответственно), ложноперирированных – 40 крыс (ЛО1 и ЛО2, соответственно) и сиалоаденэктомированных – 40 крыс (СЭ1 и СЭ2, соответственно).

Для формирования гипертрофии БСЖ крысам АР1 и АР2 групп под эфирным наркозом проводили многократную ампутацию верхних и нижних резцов каждые три дня в течение 2 недель (всего 5 ампутаций) до уровня 1-2 мм от десневого края [Wells H. et al., 1959]. Крысы контрольных (К1 и К2) групп подвергались

процедуре наркотизации в аналогичные сроки эксперимента. Контрольных (К1 и К2) и подвергшихся многократной ампутации резцов (AP1 и AP2) животных выводили из эксперимента на 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 неделю. Для исследования у крыс забирали семенники, поднижнечелюстные, подъязычные и околоушные слюнные железы.

Животным СЭ1 и СЭ2 групп под наркозом (золетил, 5 мг/100 г (массы тела), интраперитонеально) проводили тотальное двустороннее удаление БСЖ: околоушных, поднижнечелюстных и подъязычных. Ложное вмешательство животным ЛО1 и ЛО2 групп проводилось аналогичным образом за исключением выделения и удаления БСЖ. Выведение из эксперимента животных ИН1, ИН2, ЛО1, ЛО2, СЭ1 и СЭ2 групп осуществлялось через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 недель, для исследования использовали семенники.

Содержание, уход и выведение крыс из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987 г.). Выведение крыс из эксперимента осуществлялось в одно время суток асфиксией углекислым газом.

Материал для гистологического и иммуногистохимического исследования фиксировали в 10% забуференном (рН 7,4) формалине (БиоВитрум, Россия), промывали в воде, обезвоживали в Isoprep (БиоВитрум, Россия), заливали в парафиновую смесь HISTOMIX (БиоВитрум, Россия) [Коржевский Д.Э. и др., 2010]. Срезы (толщиной 5 мкм) готовили на полуавтоматическом микротоме (МЗП 01 – Техном, Россия). Для гистологического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином [Саркисов Д.С. и др., 1996]. Иммуногистохимически непрямой пероксидазным методом выявляли ЭФР и анти-РЭФР. Использовали поликлональные антитела ab2430 и ab77851 (Abcam, UK), соответственно. В каждой серии окрашивания осуществляли постановку отрицательного контроля [Петров С.В. и др., 2004].

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) фрагменты органов

фикси́ровали в 4% параформальдегиде (Serva, Германия) 24 ч при 4°C, затем в 1% OsO₄ (SPI, США) 3 ч при 4°C [Kuo J., 2007]. Образцы обезвоживали в этиловом спирте, после чего заливали в смесь эпоксидных смол (Epon 812 – 4 г, Araldite 502 – 2 г, DDSA – 9 г). На ультратоме Leica EM UC 7 (Leica, Австрия) получали полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (80 нм) срезы. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим; ультратонкие срезы помещали на гексагональные медные сетки (D=3 мм, 200 mesh), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, затем просматривали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония). Оценивали ультраструктуру сперматогенных клеток, сустентоцитов и клеток Лейдига семенников; клеток ацинусов, вставочных и исчерченных протоков, гранулярных извитых трубок поднижнечелюстных желёз.

На гистологических препаратах БСЖ измеряли площадь ацинусов (не менее 50 на каждом срезе) при помощи программы ImageJ 1.48, а также удельный объём внутридольковых протоков поднижнечелюстных желёз методом точечного счета [Гуцол А.А. и др., 1986; Автандилов Г.Г., 1990]. На препаратах поднижнечелюстных желёз подсчитывали количество ЭФР-позитивных клеток в 1 мм² среза. На электронограммах измеряли площадь клеток ацинусов поднижнечелюстных слюнных желёз, не менее 50 с каждой сетки (ImageJ 1.48).

На препаратах семенников измеряли диаметр извитых семенных канальцев и их просвета в 50 строго поперечных срезах (ImageJ 1.48), подсчитывали количество клеток с морфологическими признаками гибели и многоядерных сперматид на 1 мм² среза семенника [Ухов Ю.И. и др, 1983]. Не менее чем в 50 строго поперечных срезах извитых семенных канальцев подсчитывали количество сперматогоний, сперматоцитов, ранних и поздних сперматид, а также клеток Сертоли в перерасчете на каналец. Индекс сперматогенеза вычисляли по формуле $ИС=(4\times a_4+3\times a_3+2\times a_2+a_1)/A$, где a_4 – число канальцев, содержащих 4 популяции половых клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды), a_3 – 3 популяции (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды), a_2 – 2 популяции (сперматогонии и сперматоциты), a_1 – 1 популяцию (сперматогонии); A –

количество проанализированных канальцев ($A=50$). В 1 мм^2 среза семенника учитывали количество РЭФР-позитивных сперматогоний и поздних сперматид. На трансмиссионных электронограммах измеряли площадь ядер и цитоплазмы клеток Лейдига (ImageJ 1.48).

Обработку результатов производили с помощью статистического пакета «SPSS 17.0». Проверку распределения на соответствие нормальному закону осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представлены в виде медианы и квартилей – $Me(Q_1;Q_3)$. Для выяснения достоверности различий значений морфометрических показателей между экспериментальными группами и внутри групп, использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для моделирования гипертрофии БСЖ крыс был использован метод многократной ампутации резцов [Wells H. et al., 1959]. Структура и морфометрические показатели околоушных и подъязычных желёз неполовозрелых и половозрелых крыс не изменяются в результате многократной ампутации резцов, тогда как в поднижнечелюстных железах наблюдается увеличение площади ацинусов за счет увеличения площади их эпителиоцитов. В ранние сроки эксперимента (2-3 нед.) в поднижнечелюстных железах крыс AP1 и AP2 групп в клетках ацинусов наблюдаются признаки гиперплазии гранулярного ЭПР (грЭПР) (рис.1А, 1Б), которые позднее (3-4 нед.) сменяются признаками задержки выделения секрета и альтерации митохондрий.

Гибель эпителиоцитов ацинусов поднижнечелюстных желёз крыс AP1 и AP2 групп компенсируется появлением в их составе двуядерных клеток (3-4 нед.) (рис.1В). Нормализация структуры клеток ацинусов наблюдается с 6 недели эксперимента.

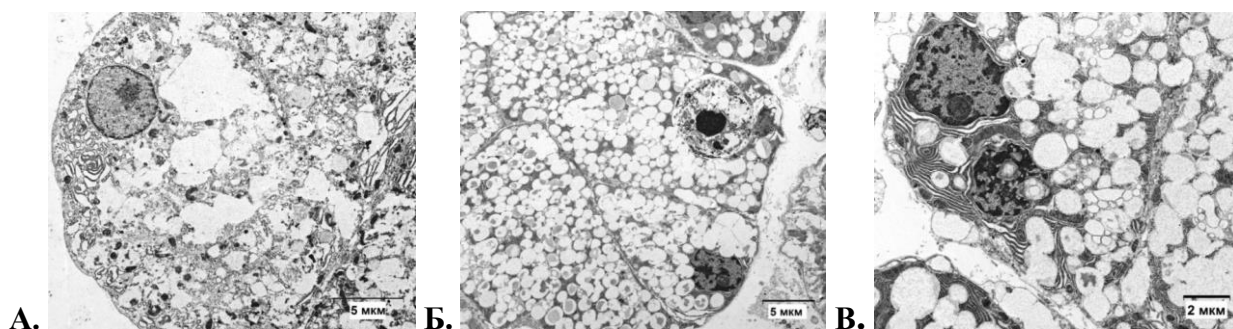


Рис. 1. А. Клетка ацинуса поднижнечелюстной железы крысы AP1 группы, 2 нед. эксперимента. Расширение цистерн грЭПР. Разрушение мембран секреторных гранул. Б, В – фрагмент ацинуса поднижнечелюстной железы крысы AP2 группы, 3 нед. эксперимента. Аутолизосома в клетке ацинуса (Б). Двухядерная клетка (В). ТЭМ.

В исчерпанных протоках поднижнечелюстных желез крыс AP1 группы на всем протяжении эксперимента обнаруживаются единичные GCT клетки (granular convoluted tubule cells – клетки гранулярных извитых трубок). У крыс AP2 группы единичные GCT клетки обнаруживаются на 2-10 неделе, гранулярные извитые трубки определяются лишь с 12 недели после начала ампутации резцов. В поднижнечелюстных железах крыс AP1 и AP2 групп определяется снижение удельного объема внутридольковых протоков (2 нед.) и уменьшение количества ЭФР-позитивных клеток на всем протяжении эксперимента (рис. 2, 3).

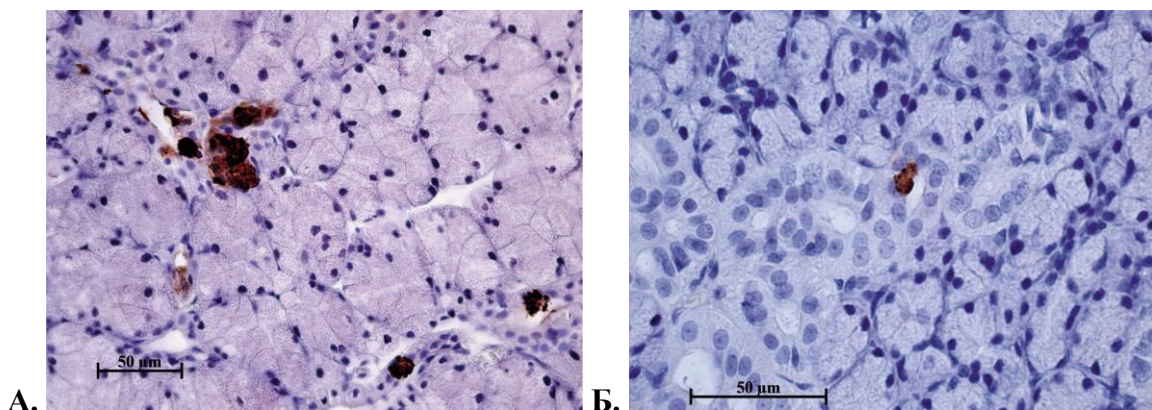


Рис. 2. Поднижнечелюстная железа крысы AP1 группы, 6 нед. эксперимента (А), и крысы AP2 группы, 2 нед. эксперимента (Б). Единичные ЭФР+ клетки в составе гранулярных извитых трубок. Иммуногистохимическая реакция на ЭФР с докраской гематоксилином.

Небольшое количество секреторных гранул в цитоплазме GCT клеток, вероятно, является результатом угнетения их синтетической деятельности.

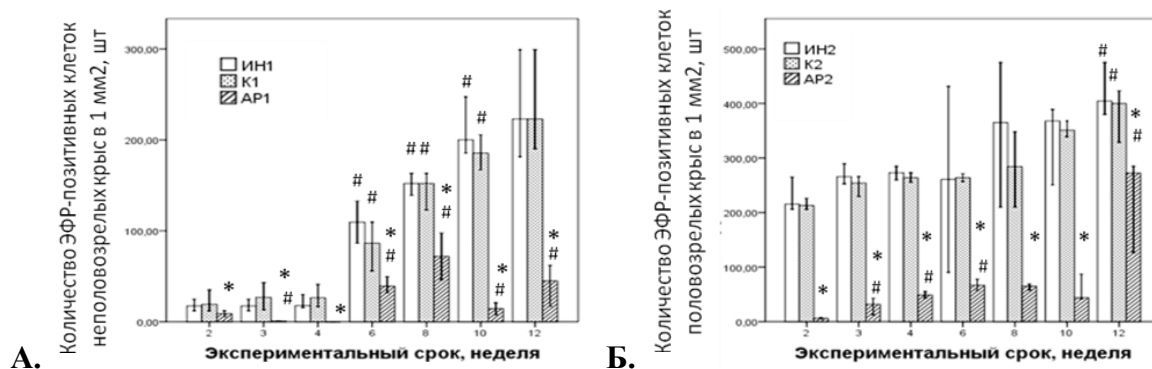


Рис. 3. Динамика количества ЭФР+ клеток в 1 мм² среза поднижнечелюстных желёз неполовозрелых (А) и половозрелых (Б) крыс. # - отличие показателя от его значения на предыдущей неделе этой же группы, $p < 0,05$; * - отличие от соответствующего показателя интактной группы, $p < 0,05$.

В семенниках крыс 1 группы в ходе эксперимента наблюдается становление экзо- и эндокринной функций. У крыс AP1 группы в извитых семенных канальцах позднее, по сравнению с интактными животными, появляются поздние сперматиды (4 нед.) и сперматозоиды (6 нед.). В семенниках крыс AP1 группы наблюдаются клетки с морфологическими признаками гибели и многоядерные сперматиды (2-4 нед.), свидетельствующие о нарушении течения I и II деления мейоза [Johannisson R. et al., 2003], что приводит к снижению количества сперматоцитов (2-3 нед.), ранних и поздних сперматид (4 нед.), а также снижению ИС (3-10 нед.). Увеличение количества сперматогоний (2 нед.) может быть направлено на восполнение численности половых клеток. Снижение диаметра извитых семенных канальцев крыс AP1 группы (4-10 нед.) связано с уменьшением диаметра их просвета и отражает угнетение функциональной активности клеток Сертоли [Sharpe R.M. et al., 2003].

У крыс AP1 группы наблюдается уменьшение количества РЭФР-позитивных поздних сперматид в 1 мм² среза семенника (2-4 неделя). Интенсивность иммуноокрашивания сперматогоний крыс AP1 группы в ранние сроки эксперимента выше, чем у интактных крыс, что является ответной реакцией на снижение секреторной активности GCT клеток поднижнечелюстных желёз.

В семенниках крыс AP1 группы наблюдается вакуолизация цитоплазмы sustentоцитов (2-3 нед.), что вносит вклад в развитие дегенеративных изменений

сперматогенных клеток в ранние сроки эксперимента [Creasy, D.M., 2001; Tooscheck C. et al., 2016]. Повышение электронной плотности матрикса митохондрий сперматогоний свидетельствует о функциональном напряжении клетки [Pavelka M. et al., 2015]. В сперматоцитах и ранних сперматид (рис. 4А) определяются выраженная вакуолизация цитоплазмы, набухание и деструкция митохондрий. Выраженность ультраструктурных изменений сперматоцитов и ранних сперматид снижается к 4 неделе эксперимента.

Многочисленная ампутация резцов неполовозрелым крысам приводит к замедлению становления функциональной активности дефинитивной популяции клеток Лейдига. В семенниках крыс AP1 группы на 2-3 неделе развиваются ультраструктурные признаки деструкции (повреждение плазмолеммы, митохондрий) клеток Лейдига, которые позднее (4-6 нед.) нивелируются. Изменение морфологии митохондрий и агранулярного ЭПР (аЭПР) свидетельствуют о низкой функциональной активности клеток Лейдига (рис. 4Б) [Боков Д.А. и др., 2009; Garcia T.X. et al., 2014].

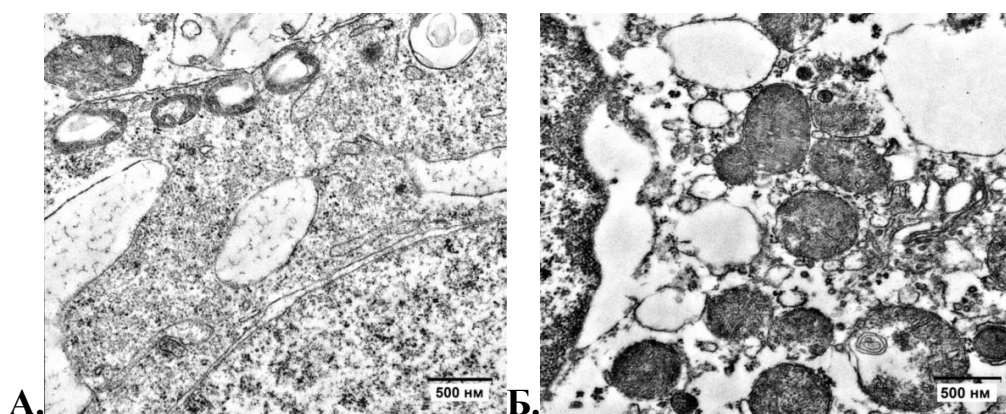


Рис. 4. Фрагмент ранней сперматиды (А) и клетки Лейдига (Б) крысы AP1 группы, 3 нед. эксперимента. Набухание и деструкция митохондрий, вакуолизация цитоплазмы (А). Деструкция митохондрии, расширение цистерн аЭПР и перинуклеарного пространства (Б). ТЭМ.

Ультраструктура клеток Лейдига животных AP1 группы нормализуется к 8 неделе, тогда как площадь цитоплазмы остается ниже, чем у интактных и контрольных крыс, до конца эксперимента.

Проведение ложной операции неполовозрелым животным не влияет на структуру и морфометрические показатели семенников. У крыс СЭ1 группы поздние сперматиды и сперматозоиды в семенниках появляются позднее, чем у интактных животных, что приводит к снижению ИС (1 нед.) и может быть вызвано отсутствием эндокринного влияния БСЖ. В извитых семенных канальцах крыс СЭ1 группы обнаруживается большее количество многоядерных сперматид и клеток с морфологическими признаками гибели (1-4 нед.), чем у интактных крыс. В семенниках крыс СЭ1 группы наблюдается снижение количества сперматоцитов (2-3 нед.), ранних (2 нед.) и поздних (4 нед.) сперматид. Увеличение количества сперматогоний на 2 неделе эксперимента является компенсаторной реакцией на гибель половых клеток на 1-4 неделе после удаления БСЖ. Уменьшение диаметра извитых семенных канальцев и внутритубулярного просвета (2-6 нед.) у крыс СЭ1 группы можно связать с угнетением выработки сустентоцитами жидкой среды канальца. Изменения структуры семенников неполовозрелых крыс нивелируются к 8 неделе после удаления БСЖ.

В семенниках крыс СЭ1 группы наблюдается увеличение количества РЭФР-позитивных сперматогоний (3 нед.). Высокая интенсивность окрашивания РЭФР в сперматогониях крыс СЭ1 группы указывает на усиление его экспрессии, вызванное депривацией ЭФР в результате удаления БСЖ – его основного источника. У крыс СЭ1 группы, на фоне снижения общего количества поздних сперматид в извитых семенных канальцах, наблюдается более позднее появление РЭФР-позитивных поздних сперматид.

Удаление БСЖ неполовозрелым крысам вызывает неспецифические структурные изменения клеток Сертоли (вакуолизация цитоплазмы и набухание митохондрий), а также приводит к накоплению в цитоплазме липидных включений в результате фагоцитоза дегенерирующих половых клеток [Rune G.M. et al., 1991]. В сперматогенных клетках (рис. 5А) наблюдаются альтерация и деструкция митохондрий, что сопряжено с работой активных форм кислорода и инициацией клеточной гибели (1-2 нед.) [Новиков В.Е. и др., 2014].

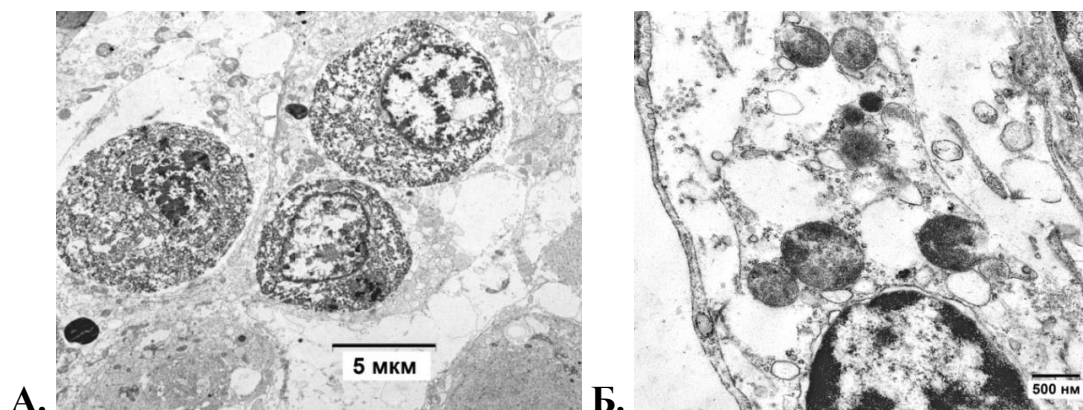


Рис. 5. А. Деструкция половых клеток крысы СЭ1 группы, 2 нед. эксперимента. Б. Фрагмент клетки Лейдига крысы СЭ1 группы, 3 нед. эксперимента. Расширение перинуклеарного пространства и элементов аЭПР, разрушение мембран и повышение электронной плотности матрикса митохондрий. ТЭМ.

В результате тотальной сиалоаденэктомии (1-3 нед.) развиваются деструктивные изменения (нарушение целостности плазмолеммы, повреждение митохондрий, расширение везикул аЭПР) клеток Лейдига (рис. 5Б), что делает невозможным протекание начальных реакций синтеза андрогенов [Svechnikov K. et al., 2010]. Структура клеток Лейдига крыс СЭ1 группы нормализуется к 8 неделе, площадь цитоплазмы – к 12 неделе эксперимента.

Наркотизация половозрелых крыс диэтиловым эфиром не вызывает развития структурных изменений сперматогенного эпителия и клеток Лейдига семенников. В семенниках крыс АР2 группы (2-3 нед.) обнаруживаются погибшие клетки и многоядерные сперматиды, наблюдается снижение количества ранних и поздних сперматид (2-3 нед.), в просвете извитых семенных канальцев отсутствуют сперматозоиды (2 нед.), индекс сперматогенеза снижен (2-3 нед.). У крыс АР2 группы диаметр извитых семенных канальцев меньше, чем у интактных животных, за счет уменьшения их просвета (2-10 нед.).

Многократная ампутация резцов не вызывает у половозрелых крыс изменения количества РЭФР-позитивных сперматогоний, но приводит к снижению количества иммунопозитивных поздних сперматид (2, 3 и 8 нед.).

В семенниках крыс АР2 группы развиваются неспецифические ультраструктурные изменения sustentocитов (крупные везикулы в цитоплазме), а

также выраженные деструктивные изменения клеток дифферона сперматозоида (2-3 нед.). В цитоплазме sustentоцитов определяются фагоцитированные фрагменты разрушенных сперматогенных клеток. В сперматогониях крыс AP2 группы наблюдается набухание митохондрий, которое в сперматоцитах и ранних сперматиде (рис. 6А) сопровождается разрушением внутренней мембраны, образованием миелиноподобных структур в матриксе, что свидетельствует о нарушении энергетического обмена (2-3 нед.). В отдельных сперматоцитах и сперматиде определяются ультраструктурные признаки гибели (рис. 6Б).

В клетках Лейдига (2-3 нед.) крыс AP2 группы наблюдается нарушение целостности плазмолеммы, уменьшение количества митохондрий и расширение элементов аЭПР, что свидетельствует о низкой функциональной активности клеток [Боков Д.А. и др., 2009]. Уменьшение размеров клеток Лейдига и удельного объёма их органелл сопровождается угнетением стероидогенеза [Mori H. et al., 1980]. Нормализация структуры клеток Лейдига развивается в меньшие сроки (с 6 нед.), чем у подвергшихся аналогичному воздействию неполовозрелых крыс.

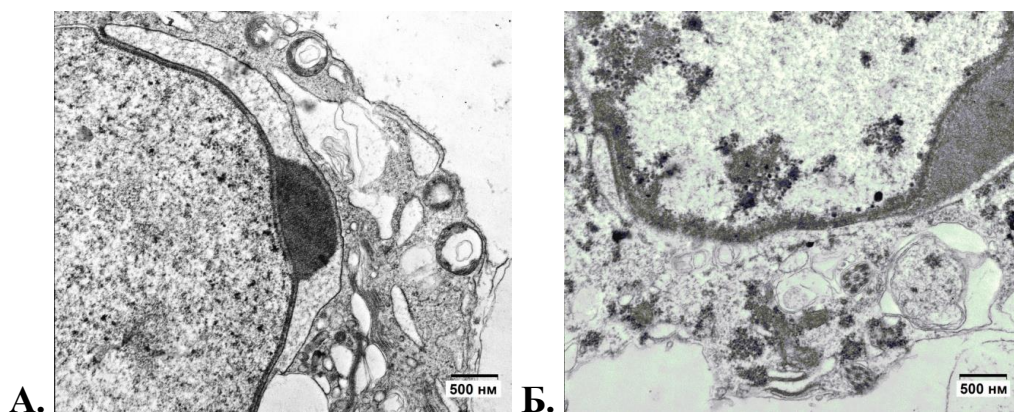


Рис. 6. А. Фрагмент сперматиды крысы AP2 группы, 3 нед. эксперимента. Вакуолизация цитоплазмы. Набухание и лизис внутренней мембраны митохондрий. Б. Гибель половой клетки крысы AP2 группы, 2 нед. эксперимента. Конденсация гетерохроматина под кариолеммой. ТЭМ.

Проведение ложной операции половозрелым крысам не вызывает морфофункциональных изменений сперматогенного эпителия и клеток Лейдига. Удаление БСЖ половозрелым крысам приводит к снижению количества ранних и

поздних сперматид (2-3 нед.), появлению многоядерных сперматид (1-2 нед) и сперматогенных клеток с морфологическими признаками гибели (1 нед.) в семенниках. В просвете извитых семенных канальцев крыс СЭ2 группы не обнаруживаются сперматозоиды (1-2 нед.), что проявляется снижением ИС. Диаметр извитых семенных канальцев животных СЭ2 группы на 2-4 неделе эксперимента ниже, чем у интактных крыс за счет уменьшения просвета канальцев.

В семенниках крыс СЭ2 группы наблюдается усиление интенсивности иммуногистохимического окрашивания РЭФР в ранние сроки эксперимента. Следствием удаления БСЖ является уменьшение количества РЭФР-позитивных поздних сперматид (1-2 нед.), наблюдаемое на фоне снижения общего количества поздних сперматид на извитой семенной каналец.

У крыс СЭ2 группы (1-4 нед.) наблюдается вакуолизация цитоплазмы клеток Сертоли (рис. 7А). Альтерация клеток Сертоли влечет за собой дегенерацию сперматогенных клеток. В сперматоцитах и ранних сперматидах (1-4 нед.) наблюдается набухание митохондрий (рис. 7Б), расширение цистерн грЭПР и комплекса Гольджи. Ультраструктурные изменения в части сперматоцитов и ранних сперматид становятся необратимыми, что приводит к их гибели.

У крыс СЭ2 группы наблюдается (1-2 нед.) уменьшение площади ядра и цитоплазмы, нарушение целостности плазмолеммы, уменьшение количества митохондрий клеток Лейдига, что указывает на снижение их стероидогенной активности [Шевлюк Н.Н., 2010]. Андрогены необходимы для протекания мейоза и спермиогенеза [Chen S.R. et al., 2016], продукции канальцевой жидкости клетками Сертоли [Walker W.H. et al., 2005]. Подавление [Peltola V. et al., 1996] или чрезмерная активация стероидогенеза в клетках Лейдига приводят к усилению окислительного стресса в семенниках [Gautam D.K. et al., 2007].

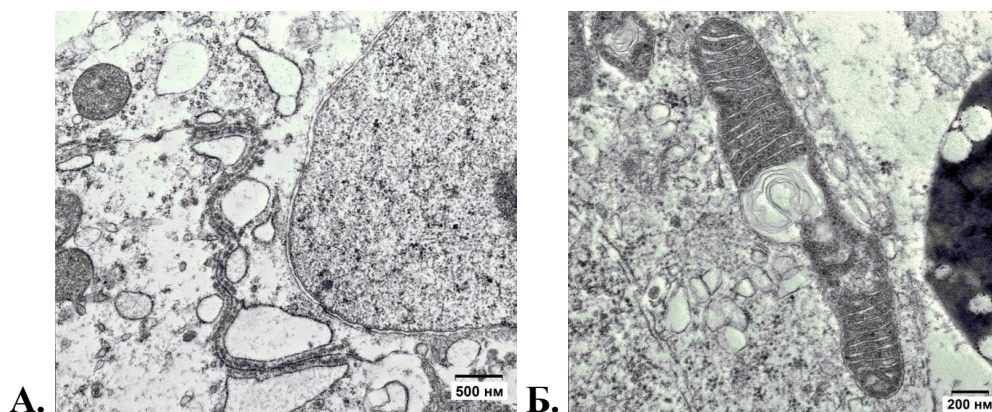


Рис. 7. А. Фрагмент sustentоцита крысы СЭ2 группы, 4 нед. эксперимента. Расширение цистерн грЭПР. Б. Фрагмент цитоплазмы сперматоцита крысы СЭ2 группы, 2 нед. эксперимента. Миелинизация структуры митохондрий. ТЭМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндокринная секреция БСЖ изучена в гораздо меньшей степени, чем экзокринная, и представляет значительный интерес для исследователей.

Несмотря на развитие гипертрофии БСЖ, в семенниках неполовозрелых и половозрелых животных в ранние сроки после многократной ампутации резцов наблюдаются признаки дегенерации извитых семенных канальцев (наличие сперматогенных клеток с морфологическими признаками гибели, многоядерных сперматид). Это объясняется тем, что в результате многократной ампутации резцов признаки гипертрофии отмечаются лишь в эпителиоцитах ацинусов поднижнечелюстных желёз, тогда как ГСТ клетки, являющиеся источником ЭФР, ФРН, ФРФ и др., оказываются менее развитыми, чем у интактных животных. Именно гранулярные извитые трубки являются структурами, обеспечивающими влияние БСЖ на семенники крыс. Количество ЭФР-позитивных ГСТ клеток остается сниженным после многократной ампутации резцов на всем протяжении эксперимента. Изменения структуры и морфометрических показателей семенников в ответ на многократную ампутацию резцов дольше сохраняются в группе неполовозрелых животных.

Тотальная сиалоаденэктомия вызывает аналогичные изменения в семенниках неполовозрелых и половозрелых животных, связанные с уменьшением

концентрации биологически активных факторов БСЖ, в частности ЭФР, в плазме крови [Tokida N. et al., 1988]. Структурные изменения сустентоцитов, интерстициальных эндокриноцитов и сперматогенных клеток, вызванные удалением БСЖ, дольше определяются в группе неполовозрелых крыс.

Таким образом, изменения в семенниках после тотальной сиалоаденэктомии или многократной ампутации резцов заключаются в нарушении протекания мейоза II и спермиогенеза, более выражены у неполовозрелых крыс, что объясняется вовлеченностью БАВ слюнных желез в процесс дифференцировки органов репродуктивной системы самцов, в частности, посредством модуляции активности рецепторов андрогенов [Bai S. et al., 2008]. Удаление БСЖ, также как проведение многократной ампутации резцов, замедляет становление функциональной активности дефинитивной популяции клеток Лейдига. Более выражены структурные изменения в семенниках крыс после тотальной сиалоаденэктомии. К концу эксперимента морфофункциональные изменения семенников, развивающиеся в ответ на удаление БСЖ или моделирование их гипертрофии путём многократной ампутации резцов, нивелируются. Это объясняется компенсаторно-приспособительными механизмами: увеличением синтеза биологически активных факторов БСЖ другими источниками в организме крыс [Scheving L.A. et al., 1989; Kelly E. et al., 1997; Zeng F. et al., 2014]. На органы репродуктивной системы самцов грызунов влияют также сиалорфин и паротин, продуцируемые клетками ацинусов БСЖ. Комплексная оценка выработки и секреции БАВ при гипертрофии БСЖ, вызванной многократной ампутацией резцов, является предметом дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. У неполовозрелых крыс в результате моделирования гипертрофии больших слюнных желёз путём многократной ампутации резцов в семенниках определяется комплекс морфофункциональных изменений (снижение морфометрических показателей, деструктивные изменения сперматогенных клеток, признаки альтерации сустентоцитов и интерстициальных

эндокриноцитов), который сохраняется на протяжении эксперимента и приводит к задержке становления сперматогенеза и стероидогенеза.

2. Моделирование гипертрофии больших слюнных желёз путём многократной ампутации резцов половозрелым крысам вызывает менее выраженные, по сравнению с неполовозрелыми животными, структурные изменения семенников (повреждение сперматогенных клеток, сустентоцитов и интерстициальных эндокриноцитов), которые нивелируются к 12 неделе эксперимента.

3. Тотальная сиалоаденэктомия у неполовозрелых крыс приводит к структурно-функциональным изменениям в семенниках (снижение морфометрических показателей, а также альтерация сустентоцитов, интерстициальных эндокриноцитов и сперматогенных клеток) и замедлению становления сперматогенной и стероидогенной функции, выраженность которых снижается к 12 неделе эксперимента.

4. Тотальная сиалоаденэктомия у половозрелых крыс вызывает однонаправленные, но менее выраженные, чем у неполовозрелых животных, морфофункциональные изменения в семенниках, которые полностью нивелируются к 10 неделе эксперимента.

Список использованных сокращений

аЭПР – агранулярный эндоплазматический ретикулум

БСЖ – большие слюнные железы

БАВ – биологически активные вещества

грЭПР – гранулярный эндоплазматический ретикулум

ИС – индекс сперматогенеза

РЭФР – рецептор эпидермального фактора роста

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ФРН – фактор роста нервов

ФРФ – фактор роста фибробластов

ЭФР – эпидермальный фактор роста

GCT (granular convoluted tubule) –гранулярные извитые трубки

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Половой диморфизм больших слюнных желез у грызунов / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, О.Н. Серебрякова, А.В. Бузенкова // **Морфология (0,738)**. – 2016. – Т. 149. – № 2. С. 89-95.
2. Пищеварительные и непивцеварительные функции больших слюнных желез грызунов / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, О.Н. Серебрякова, А.В. Бузенкова // **Успехи физиологических наук (1,672)**. – 2017. – Т. 48. – № 1. С. 66-79.
3. Иванова, В.В. Изменения морфофункционального состояния семенников крыс под влиянием гипертрофии больших слюнных желез / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло // **Морфология (0,738)**. – 2017. – Т. 151. – № 2. С. 65-70.
4. Изменение структур семенников крыс под влиянием тотальной сиалоаденэктомии / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.С. Буянкина // **Морфология (0,738)**. – 2017. – Т. 152. – № 4. – С. 56-60.
5. Моделирование гипертрофии больших слюнных желез у неполовозрелых крыс: морфометрическая и гистохимическая характеристика эпителиоцитов / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.Н. Дзюман // **Бюллетень сибирской медицины (0,313)**. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 61-69.
6. Ультроструктурная характеристика интерстициальных эндокриноцитов семенников половозрелых крыс после тотальной сиалоаденэктомии / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.А. Миллер // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины (0,385)**. – 2018. – Т. 165. - № 2. – С. 248-252.
7. Иванова, В.В. Морфо-функциональное состояние эпителиоцитов поднижнечелюстных слюнных желез на фоне многократной ампутации резцов у половозрелых крыс / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло // **Бюллетень сибирской медицины (0,313)**. – 2018. — Т. 16. – № 1. – С. 53-58.
8. Иванова, В.В. Влияние больших слюнных желез крыс на развитие и морфофункциональное состояние семенников в постнатальном онтогенезе / В.В. Иванова // **Морфология (0,738)**. – 2016. – Т.149. – № 3. – С. 92.
9. Иванова, В.В. Влияние многократной ампутации резцов и тотальной сиалоаденэктомии на семенники крыс / В.В. Иванова, О.Н. Серебрякова, А.В. Бузенкова // Научный фонд «Биолог». – 2016. Т. – 16. – № 2. – С. 16-20.
10. Иванова В.В. Влияние сиалоаденэктомии на морфофункциональное состояние семенников неполовозрелых крыс / В.В. Иванова // **Вестник ЮКГФА**. – 2016. – Т. 77. – № 4. – С. 61-62.
11. Иванова, В.В. Морфофункциональная характеристика эпителиоцитов поднижнечелюстных слюнных желез половозрелых крыс при многократной ампутации резцов / В.В. Иванова, О.Н. Серебрякова // **Материалы I Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки –**

- фундаментальная основа практической медицины». – Новосибирск: изд-во НГМУ, 2016. – С. 80-82.
12. Серебрякова, О.Н. Влияние тотальной сиалоаденэктомии на сперматогенез неполовозрелых крыс / О.Н. Серебрякова, В.В. Иванова // Материалы I Международной морфологической научно-практической конкурсно-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины». – Новосибирск: изд-во НГМУ, 2016. – С. 159-161.
 13. Иванова В.В. Влияние многократной ампутации резцов на структуру семенников неполовозрелых крыс / В.В. Иванова, О.Н. Серебрякова // Фундам. наука клин. мед.– 2017. – Т. 20. – С. 228-229.
 14. Серебрякова О.Н. Влияние удаления больших слюнных желез на сперматогенез неполовозрелых крыс / О.Н. Серебрякова, В.В. Иванова // Фундам. наука клин. мед.– 2017. – Т. 20. – С. 505-506.
 15. Иванова В.В. Морфометрическое исследование семенников половозрелых крыс после многократной ампутации резцов / В.В. Иванова, О.Н. Серебрякова // Тезисы докладов XVIII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины» – Владивосток: Медицина ДВ, 2017. – С. 307-308.
 16. Серебрякова О.Н. Влияние удаления больших слюнных желез на сперматогенез крыс / О.Н. Серебрякова, В.В. Иванова // Тезисы докладов XVIII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины» – Владивосток: Медицина ДВ, 2017. – С. 318-319.
 17. Иванова В.В. Влияние тотальной сиалоаденэктомии на ультраструктуру интерстициальных эндокриноцитов крыс / В.В. Иванова, И.В. Мильто // Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии. Материалы Всероссийской конференции молодых специалистов. – Рязань: изд-во РГМУ, 2017. – С. 26-28.
 18. Иванова В.В. Влияние тотальной сиалоаденэктомии на ультраструктуру клеток Лейдига неполовозрелых крыс / В.В. Иванова // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека». – Оренбург: «Южный Урал», 2017. – С. 90-92.
 19. Иванова, В.В. Влияние многократной ампутации резцов на ультраструктуру интерстициальных эндокриноцитов неполовозрелых крыс / В.В. Иванова, И.В. Мильто, И.В. Суходоло // «Вопросы морфологии XXI века» Сборник трудов: «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» / под. ред. И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича - СПб.: Издательство ДЕАН, 2018. – С.140-143.

Подписано в печать «___» _____ 2018 г.

Усл. авт. листов 1. Печать на ризографе.

Отпечатано в издательстве СибГМУ

634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 8 (3822) 901-101 доб. 1759

Заказ № _____. Тираж 100 экземпляров.