

© В. В. Иванова, И. В. Мильто, И. В. Суходоло, 2017
УДК 616.316-007.61:599.463.2:599.323.4

В. В. Иванова¹, И. В. Мильто^{1, 2}, И. В. Суходоло¹

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПЕРТРОФИИ БОЛЬШИХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

¹ Кафедра морфологии и общей патологии (зав. — проф. И. В. Суходоло), ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; ² кафедра биотехнологии и органической химии (зав. — проф. Е. А. Краснокутская), ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Гистологическими, морфометрическими и иммуногистохимическими методами изучено влияние гипертрофии больших слюнных желез, вызванной многократной ампутацией резцов (МАР), на структуру семенников неполовозрелых (21-суточных, $n=35$) и половозрелых (2-месячных, $n=35$) крыс. Контролем служили органы 70 интактных животных соответствующих возрастных групп. Показано, что МАР у животных обеих возрастных групп приводит к снижению индекса сперматогенеза, появлению в составе популяции половых клеток большого количества погибших форм. МАР вызывала гипертрофию ацинусов поднижнечелюстных желез. Иммуногистохимическое исследование показало, что МАР приводит к снижению количества клеток гранулярных извитых трубочек, экспрессирующих эпидермальный фактор роста (ЭФР) в поднижнечелюстных железах половозрелых и неполовозрелых животных. В семенниках крыс всех изученных групп выявлен рецептор ЭФР. Предполагается, что угнетение сперматогенеза у крыс, подвергшихся МАР, связано со снижением выработки ЭФР большими слюнными железами.

Ключевые слова: семенники, большие слюнные железы, ампутация резцов, эпидермальный фактор роста

Большие слюнные железы у грызунов являются не только экзокринными, но и эндокринными. Наряду с синтезом и секрецией пищеварительных ферментов, они продуцируют факторы роста и гормоны [3]. Ряд работ посвящены изучению влияния частичной или полной сиалоаденэктомии на строение и функциональное состояние семенников грызунов [9–12]. Вместе с этим влияние гипертрофии больших слюнных желез на органы репродуктивной системы у самцов грызунов изучено недостаточно. Цель нашего исследования — изучение влияния гипертрофии больших слюнных желез, вызванной многократной ампутацией резцов (МАР) на структуру семенников неполовозрелых и половозрелых крыс.

Материал и методы. В эксперименте использованы неполовозрелые (21 сут, 45 ± 10 г) — 35 интактных животных (группа ИН1) и 35, подвергшихся МАР (группа АР1); а также половозрелые (2 мес, 150 ± 20 г) — 35 интактных (группа ИН2) и 35 — подвергшихся многократной ампутации резцов (группа АР2), белые беспородные крысы-самцы. Крысам групп АР1 и АР2 в течение 2 нед моделировали гипертрофию больших слюнных желез путем МАР. Нижние резцы крыс подрезали до уровня 1–2 мм выше десневого края каждые 3 сут (всего 5 ампутаций) [3]. Животных выводили из эксперимента путем асфиксии углекислым газом через 2, 3, 4, 6,

8, 10 и 12 нед после начала эксперимента (первой ампутации резцов). Для гистологического и иммуногистохимического исследования использовали околушннные, подязычные, поднижнечелюстные слюнные железы и семенники крыс. Работа выполнена с соблюдением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987 г.) и Федерального Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» (от 01.01.1997 г.). Протокол исследования одобрен решением локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России № 4253 от 28.09.2015 г.

Материал для гистологического и иммуногистохимического исследования фиксировали в 10% формалине (рН 7,4) и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, а также использовали для постановки иммуногистохимической реакции.

На срезах семенников измеряли диаметр извитых семенных канальцев при помощи программы ImageJ 1.48 и определяли индекс сперматогенеза (ИС) по формуле $ИС = (4 \times a_4 + 3 \times a_3 + 2 \times a_2 + a_1) / 50$, где a_4 — число канальцев, содержащих 4 популяции сперматогенных 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); 50 — количество проанализированных канальцев.

На срезах больших слюнных желез иммуногистохимически с использованием кроличьих антикрысиных поликлональных антител (ab77851, Abcam, Великобритания) выявляли эпи-

Сведения об авторах:

Иванова Вера Владимировна (e-mail: ivvera92@rambler.ru), Суходоло Ирина Владимировна, кафедра морфологии и общей патологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Мильто Иван Васильевич, кафедра биотехнологии и органической химии, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

дермальный фактор роста (ЭФР). В семенниках с помощью кроличьих антикрысиных поликлональных антител (ab2430, Abscam, Великобритания) выявляли рецептор ЭФР (ErbB-1). Иммуногистохимическое исследование проведено непрямой пероксидазным методом с использованием визуализирующей системы Novolink Polymer Detection System (Leica, Великобритания). Отрицательный контроль проводили путем нанесения на срезы вместо первичных антител раствора для разведения антител (AbDiluent, Leica, Великобритания). Подсчитывали количество ЭФР-позитивных клеток на 1 мм² среза поднижнечелюстных желез неполовозрелых и половозрелых крыс.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «SPSS 17.0». Проверку закона распределения на соответствие нормальному осуществляли по критерию Манна—Уитни. Результаты морфометрического исследования представлены в виде средней и стандартного отклонения ($\bar{x} \pm \sigma$). Использованы критерий Шапиро—Уилка, однофакторный дисперсионный анализ для независимых выборок и однофакторный дисперсионный анализ повторных измерений для зависимых выборок, критерий Крускала—Уоллеса.

Результаты исследования. МАР приводила к увеличению площади ацинусов поднижнечелюстных желез у крыс группы AP1 на 3–6-й неделе, группы AP2 — на 3-, 6-й и 10-й неделе по сравнению с таковой у животных групп ИН1 и ИН2 соответственно. Площадь ацинусов околоушных и подъязычных желез у неполовозрелых и половозрелых крыс в результате МАР не изменялась.

У неполовозрелых и половозрелых крыс ЭФР обнаруживался в гранулах эпителиоцитов гранулярных извитых трубочек — уникального отдела внутридольковых протоков поднижнечелюстных желез грызунов. Реакция на ЭФР не выявлялась в околоушных и подъязычных железах. В поднижнечелюстных железах крыс группы ИН1 единичные ЭФР-позитивные клетки определялись на 2–4-й неделе, их количество нарастало к концу эксперимента (табл. 1). Количество ЭФР-позитивных клеток в поднижнечелюстных

железах у животных группы AP1 на 3–4-й неделе было ниже, а на 6–12-й неделе — выше, чем в начале эксперимента (2-я неделя). Количество ЭФР-позитивных клеток у животных группы AP1 было меньше, чем у крыс группы ИН1 со 2-й по 12-ю неделю эксперимента (см. табл. 1).

Иммунопозитивные клетки в поднижнечелюстных железах у крыс группы ИН2 определялись на протяжении всего эксперимента (рис. 1, а), их количество возрастало к 8–12-й неделе (см. табл. 1). Количество иммунопозитивных клеток у крыс группы AP2 на 3–12-й неделе было значимо больше, чем на 2-й неделе, однако меньше аналогичных показателей у животных группы ИН2 на протяжении всего эксперимента (см. рис. 1, б; табл. 1).

В семенниках крыс группы ИН1 на 2-й неделе эксперимента просвет в извитых канальцах определялся в 43%, с 3-й недели — в 100%. Поздние сперматиды появлялись на 2-й, а сперматозоиды — на 3-й неделе эксперимента. В межканальцевой соединительной ткани периваскулярно и перитубулярно располагались интерстициальные эндокриноциты, которые на 2-й неделе имели веретеновидную форму, тогда как с 3-й недели эксперимента становились округлыми.

В семенниках крыс группы AP1 просвет в 51% извитых семенных канальцев обнаруживался на 2-й неделе, в 89% — на 3-й неделе, в 100% — с 4-й недели эксперимента. Поздние сперматиды начинали выявляться на 4-й неделе, а сперматозоиды — с 6-й недели эксперимента. На 2-, 3-й и 4-й неделе эксперимента в извитых семенных канальцах присутствовали округлые оксифильные клетки с гиперхромными ядрами. Количество извитых семенных канальцев, содержащих клетки с морфологическими признаками гибели, было максимальным на 3-й неделе эксперимента и достигало 46%. Интерстициальные эндокриноциты на

Таблица 1

Количество ЭФР-позитивных клеток в поднижнечелюстных железах у крыс ($\bar{x} \pm \sigma$), количество на 1 мм² среза

Экспериментальная группа	Срок эксперимента, неделя						
	2-я	3-я	4-я	6-я	8-я	10-я	12-я
ИН1	18±5 [#]	16±6 [#]	21±6 [#]	108±17 [#]	151±9 [#]	207±23 [#]	227±47 [#]
AP1	9,0±2,3 [*]	0,84±0,17 ^{**}	0,110±0,020 ^{**}	39±7 ^{#*}	71±18 ^{#*}	74±5 ^{#*}	76±12 ^{#*}
ИН2	224±24	267±13	273±9	250±123	357±96 [#]	344±54 [#]	416±36 [#]
AP2	5,8±0,9 [*]	48±12 ^{#*}	49±4 ^{#*}	67±7 ^{#*}	65±4 ^{#*}	57±20 ^{#*}	67±8 ^{#*}

* Различия по сравнению с аналогичным показателем у животных интактной группы; [#] по сравнению с показателями в этой же группе на 2-й неделе значимы при $P < 0,05$.

Примечание. Здесь и в табл. 2: ИН1 — неполовозрелые интактные животные; AP1 — неполовозрелые животные, подвергшиеся многократной ампутации резцов; ИН2 — половозрелые интактные животные; AP2 — половозрелые животные, подвергшиеся многократной ампутации резцов.

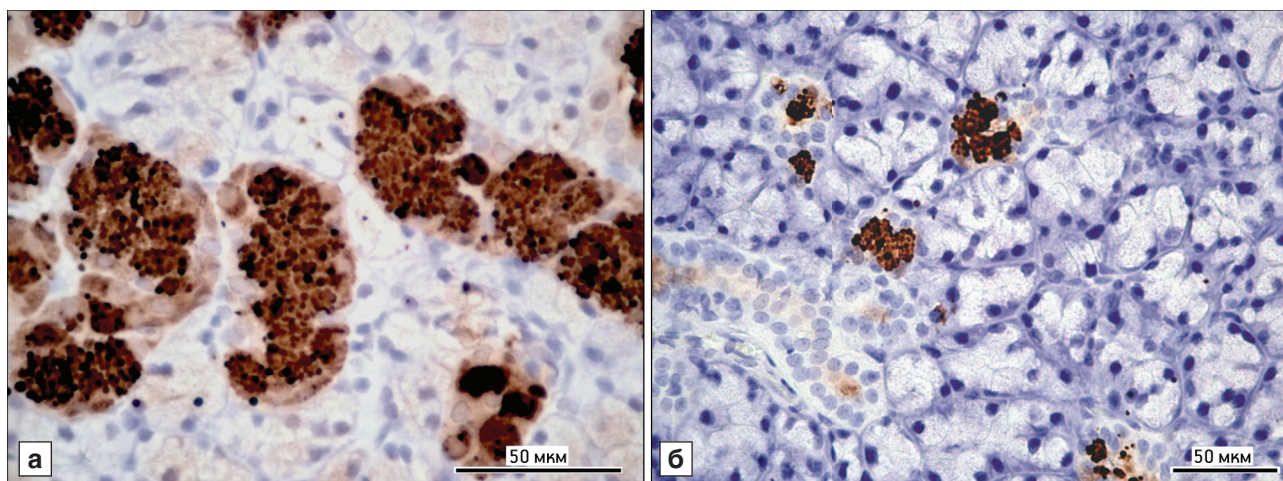


Рис. 1. Поднижнечелюстная железа половозрелой интактной крысы (а) и подвергшейся многократной ампутации резцов (б). 6 нед от начала опыта. Клетки гранулярных извитых трубок. Иммуногистохимическая реакция на эпидермальный фактор роста (ЭФР) с докраской гематоксилином

2–3-й неделе эксперимента имели веретеновидную форму и гиперхромные ядра.

Индекс сперматогенеза у крыс групп ИН1 и АР1 возрастал в ходе эксперимента. У крыс группы АР1 он был ниже, чем у животных группы ИН1 со 2-й по 10-ю неделю эксперимента (табл. 2).

В сперматогенном пласте у животных группы ИН2 на протяжении всего эксперимента обнаруживались все клеточные популяции (рис. 2, в). В семенниках у крыс группы АР2 сперматозоиды выявлялись с 3-й недели эксперимента (см. рис. 2, г). Округлые оксифильные клетки с гиперхромными ядрами на 2-й неделе эксперимента обнаруживались в составе сперматогенного пласта в 31% извитых семенных канальцев и не выявлялись у крыс группы ИН2. Интерстициальные эндокриноциты в семенниках крыс группы ИН2 имеют вид крупных округлых клеток, что свидетельствует об их высокой функциональной активности. В семенниках крыс группы АР2 интерстициальные

эндокриноциты приобретали такой вид с 4-й недели эксперимента. Индекс сперматогенеза у крыс группы АР2 был ниже, чем у животных группы ИН2 на 2-й и 3-й неделе эксперимента (см. табл. 2).

Диаметр извитых семенных канальцев у крыс групп ИН1 и АР1 увеличивался со 2-й по 12-ю неделю. МАР у неполовозрелых крыс приводила к снижению этого показателя с 3-й по 10-ю неделю эксперимента по сравнению с таковой у животных интактной группы (см. табл. 2).

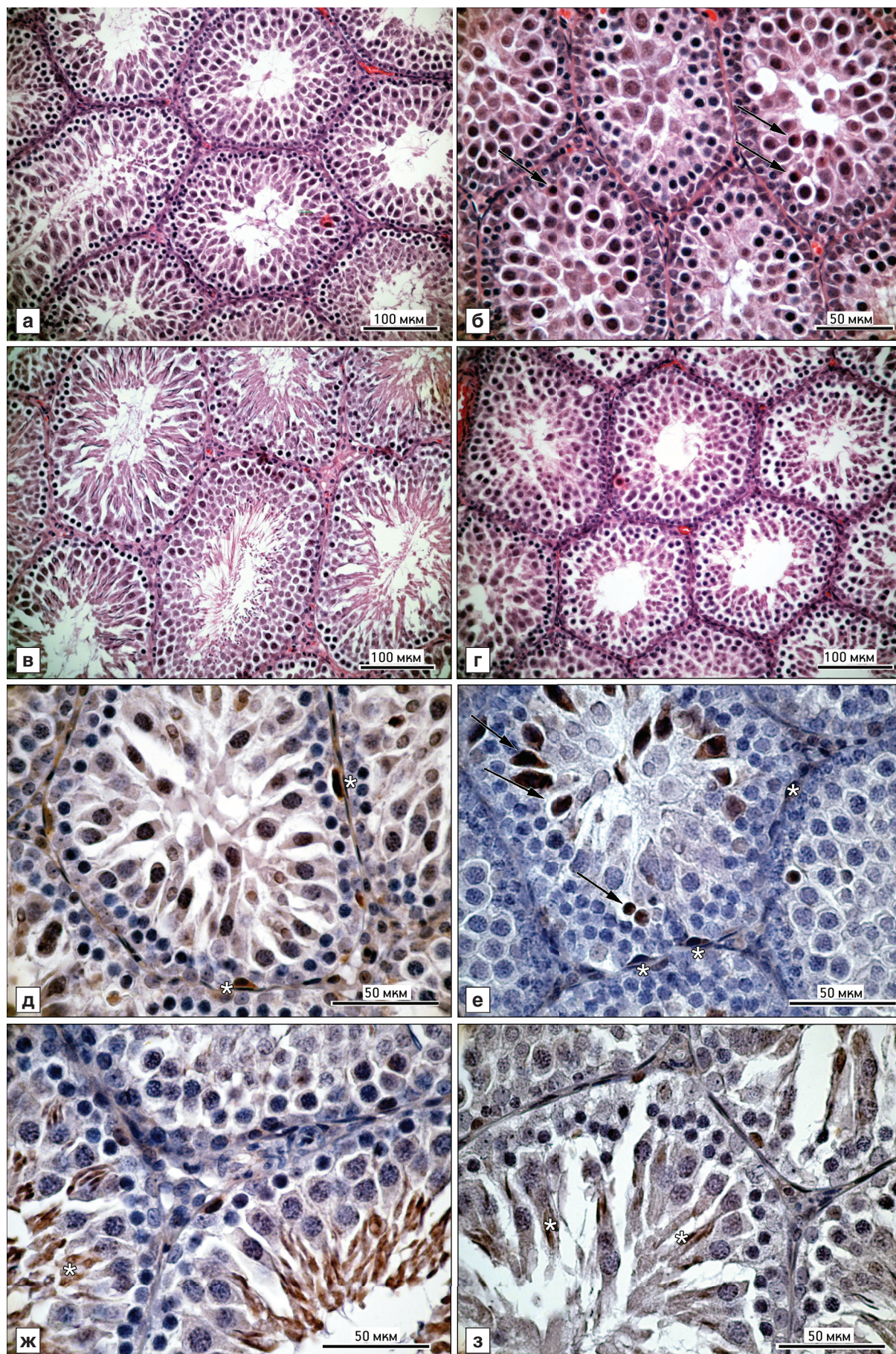
Диаметр извитых семенных канальцев у крыс групп ИН2 и АР2 увеличивался со 2-й по 8-ю неделю. После МАР у крыс группы АР2 этот показатель был меньше, чем у интактных животных, со 2-й по 10-ю неделю (см. табл. 2).

Клетки, содержащие иммунопозитивный ЭФР-рецептор, обнаруживались на протяжении эксперимента в семенниках крыс всех изученных групп. У животных групп ИН1 и АР1 ЭФР-рецептор выявлялся на плазмолемме и в цитоплаз-

Таблица 2

Морфометрические показатели семенников интактных и подвергшихся многократной ампутации резцов крыс ($\bar{x} \pm \sigma$)

Исследованные показатели	Экспериментальная группа	Срок эксперимента, неделя						
		2-я	3-я	4-я	6-я	8-я	10-я	12-я
Индекс сперматогенеза	ИН1	2,7±0,4	2,97±0,06 [#]	3,24±0,08 [#]	3,39±0,07 [#]	3,46±0,07 [#]	3,48±0,05 [#]	3,49±0,06 [#]
	АР1	2,80±0,12	2,67±0,07 [*]	2,63±0,12 [*]	3,12±0,08 [*]	3,31±0,06 ^{**}	3,18±0,07 ^{**}	3,560±0,020 [#]
	ИН2	3,55±0,14	3,46±0,10	3,53±0,09	3,59±0,07	3,51±0,04	3,49±0,04	3,47±0,06
	АР2	3,05±0,16 [*]	3,17±0,18 [*]	3,42±0,18 [#]	3,55±0,08 [#]	3,49±0,06 [#]	3,54±0,04 [#]	3,49±0,04
Диаметр извитых семенных канальцев, мкм	ИН1	169,7±20	187,0±23 [#]	237±22 [#]	305,4±38 [#]	264±19 [#]	340±27 [#]	269±23 [#]
	АР1	160±14	170,0±16 [*]	142±16 [*]	226±28 ^{**}	230,0±16 ^{**}	201±17 ^{**}	254±32 [#]
	ИН2	258±18	295±28 [#]	263±27 [#]	264±21 [#]	283±33 [#]	290±23 [#]	300±26 [#]
	АР2	201±28 [*]	204±27 [*]	213±28 ^{**}	287±26 ^{**}	223±31 ^{**}	238±33 ^{**}	275±23 [#]



ме сперматогоний (см. рис. 2, д, е), тогда как у животных групп ИН2 и АР2 — поздних сперматид (см. рис. 2, ж, з).

Обсуждение полученных данных. Взаимное влияние больших слюнных и половых желез грызунов показано в ряде работ [2, 3, 12]. Удаление больших слюнных желез вызывает морфологические изменения (снижение количества всех популяций половых клеток, индекса сперматогенеза, уменьшение диаметра извитых семенных канальцев и др.) в семенниках крыс [9–11]. Известно также, что у людей, больных гипогонадизмом и хроническим простатитом, обнаруживается увеличение околоушных желез [1, 7].

МАР способствует гипертрофии больших слюнных желез, которая проявляется увеличением площади ацинусов, главным образом, поднижнечелюстных и в меньшей степени околоушных и подъязычных желез [4–6].

В нашем эксперименте, в отличие от данных А.Г.Бабаевой и Н.В.Юдиной [4], МАР не сопровождается гипертрофией семенников. Напротив, наблюдается снижение диаметра извитых семенных канальцев по сравнению с таковым у интактных крыс со 2-й по 10-ю неделю в обеих группах, подвергшихся МАР. У животных групп АР1 и АР2 индекс сперматогенеза ниже, чем у интактных крыс. Наличие в составе сперматогенной популяции погибших клеток в ранние сроки после формирования модели гипертрофии больших слюнных желез свидетельствует о нарушении сперматогенеза.

МАР у крыс вызывает гипертрофию ацинусов поднижнечелюстных желез, в то время как эпителиоциты внутريدольковых протоков не изменяются [3]. Гранулярные извитые трубочки являются источником большого количества биологически активных факторов [3], в частности ЭФР, который оказывает существенное влияние на строение и функциональное состояние семенников грызунов, участвуя в регуляции пролиферации и дифференцировки сперматогенных клеток [10, 11]. МАР приводит к снижению количества ЭФР-позитивных клеток в поднижнечелюстных

железах неполовозрелых и половозрелых крыс по сравнению с контролем. ЭФР действует непосредственно на половые клетки, его рецепторы обнаружены на плазмолемме и в цитоплазме сперматогоний и поздних сперматид. В отличие от Т.Yang и соавт. [13] мы не наблюдали экспрессии рецептора ЭФР в интерстициальных эндокриноцитах семенников крыс. Однако ингибирование рецептора ЭФР значительно снижает сывороточное содержание тестостерона у мышей-самцов, что свидетельствует о модуляции функционального состояния интерстициальных эндокриноцитов [8].

Кроме того, на органы репродуктивной системы самцов грызунов влияют и другие биологически активные вещества, например, сиалорфин и паротин, продуцируемые ацинусами больших слюнных желез. Комплексная оценка выработки и секреции биологически активных веществ при гипертрофии больших слюнных желез, вызванной МАР, является предметом дальнейших исследований.

Таким образом, гипертрофия больших слюнных желез, вызванная МАР у крыс, сочетается со снижением индекса сперматогенеза, появлением в составе сперматогенного пласта погибших клеток. МАР вызывает гипертрофию, главным образом, поднижнечелюстных желез. Вероятно, изменение морфофункционального состояния семенников крыс в результате МАР обуславливают эндокринные факторы именно поднижнечелюстных желез. Однако неизвестно влияние подрезания резцов крыс на функциональную активность клеток ацинусов больших слюнных желез.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амерханов М.В. Клиника, диагностика и лечение сиаладеноза у больных с хроническим простатитом (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2002.
2. Афанасьев В.В., Зайратьянц О.В., Калинин С.Ю., Степаненко Р.С. Взаимосвязь слюнных и половых желез. Экспериментальное исследование // Стоматология. 2012. № 6. С. 12–15.

Рис. 2. Семенники неполовозрелой интактной крысы, подвергшейся многократной ампутации резцов.

а — в просветах отдельных извитых семенных канальцев имеются сперматозоиды; б — просвет в извитых семенных канальцах отсутствует, в составе популяции половых клеток наблюдаются исключительно сперматогонии, сперматоциты и ранние сперматиды; погибшие половые клетки (стрелки); в — семенник половозрелой интактной крысы, в извитых семенных канальцах имеются все клетки дифферона сперматозоида; г — семенник половозрелой крысы, подвергшейся многократной ампутации резцов (через 3 нед от начала опыта), в просветах извитых семенных канальцев единичные сперматозоиды; д — семенник неполовозрелой интактной крысы; иммунопозитивные сперматогонии (звездочки); е — семенник неполовозрелой крысы, подвергшейся многократной ампутации резцов на 2-й неделе от начала опыта; иммунопозитивные сперматогонии (звездочки), гибнущие сперматоциты первого порядка (стрелки); ж — семенник половозрелой интактной крысы; иммунопозитивные поздние сперматиды (звездочка); з — семенник крысы, подвергавшейся многократной ампутации резцов через 8 нед от начала опыта; иммунопозитивные поздние сперматиды (звездочки). а—г — окраска гематоксилином — эозином; д—з — иммуногистохимическая реакция на ЭФР с докраской гематоксилином

3. Бабаева А. Г., Шубникова Е. А. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: МГУ, 1979.
 4. Бабаева А. Г., Юдина Н. В. Многократная ампутация нижних резцов и феномены гипертрофии слюнных желез и семенников // Бюл. exper. биол. 1977. Т. 84, № 8. С. 220–221.
 5. Иванова В. В., Серебрякова О. Н., Бузенкова А. В. Влияние многократной ампутации резцов и тотальной сиалоаденэктомии на семенники крыс // Научный фонд БИОЛОГ. 2016. № 2. С. 16–20.
 6. Саврова О. Б. Цитологический анализ секреторного эпителия подчелюстных слюнных желез крысы, гипертрофированных под влиянием повторных ампутаций нижних резцов // Бюл. exper. биол. 1976. Т. 81, № 3. С. 376–377.
 7. Степаненко Р. С. Оценка состояния слюнных желез у мужчин при гипогонадизме и его лечении: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2014.
 8. Evalul K., Hammes S. R. Cross-talk between G Protein-coupled and Epidermal Growth Factor receptors regulates gonadotropin-mediated steroidogenesis in Leydig cells // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 41. P. 27525–27533.
 9. Russel L. D., Weis T., Goh J. C., Curl J. L. The effect of submandibular gland removal on testicular and epididymal parameters // Tissue Cell. 1990. Vol. 22, № 3. P. 263–268.
 10. Tokida N., Shinoda I., Kurobe M. et al. Effect of sialoadenectomy on the level of circulating mouse epidermal growth factor (mEGF) and on the reproductive function in male mice // J. Clin. Biochem. Nutr. 1988. Vol. 5, № 3. P. 221–229.
 11. Tsutsumi O., Kurachi H., Oka T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function // Science. 1986. Vol. 233, № 4767. P. 975–977.
 12. Walvekar M. V., Pillai M. M. Endocrine relation between submandibular gland and testes // J. Cell. Tiss. Res. 2008. Vol. 8, № 2. P. 1411–1416.
 13. Yang T., Zhao J., Li W. Epidermal Growth Factor signaling regulates the expression of metastasis tumor antigen 1 in mouse pachytene spermatocyte // Andrology. 2013. Vol. 2, № 2. P. 1–7.
- Поступила в редакцию 23.08.2016
Получена после доработки 20.12.2016
- ### CHANGES OF THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF RAT TESTES UNDER THE INFLUENCE OF HYPERTROPHY OF THE MAJOR SALIVARY GLANDS
- V. V. Ivanova¹, I. V. Mil'to^{1,2}, I. V. Sukhodolo¹*
- Histological, morphometric and immunohistochemical methods were used to study the influence of hypertrophy of the major salivary glands caused by repeated incisor amputation (RIA), on the structure of the testes of immature (21-day-old, n=35) and adult (2-month-old, n=35) rats. 70 intact animals of appropriate age groups served as control. It was shown that RIA the animals of both age groups lead to a decrease in the index of spermatogenesis, appearance of increased number of dead forms among the populations of germ cells. RIA caused hypertrophy of the acini in the submandibular glands. Immunohistochemical study showed that RIA lead to a decrease in the number of cells of granular convoluted tubules expressing epidermal growth factor (EGF) in the submandibular glands of both sexually mature and immature animals. In the testes of rats of all groups studied the EGF receptor was demonstrated. It is suggested that the inhibition of spermatogenesis in rats exposed to RIA is associated with the decreased production of EGF by major salivary glands.
- Key words:** *testis, major salivary glands, incisor amputation, epidermal growth factor*
- ¹ Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk; ² Department of Biotechnology and Organic Chemistry, National Research Tomsk Polytechnic University