

© В. В. Иванова, И. В. Мильто, И. В. Суходоло, 2017  
УДК 616.316-089.87:591.463.2:599.323.4

*В. В. Иванова<sup>1</sup>, И. В. Мильто<sup>1,2</sup>, И. В. Суходоло<sup>1</sup>, А. С. Буянкина<sup>2</sup>*

## ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУР СЕМЕННИКОВ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ТОТАЛЬНОЙ СИАЛОАДЕНЭКТОМИИ

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

Изучено влияние удаления больших слюнных желез на структуру семенников неполовозрелых (n=120) и половозрелых (n=120) крыс. Семенники интактных (n=40), ложнооперированных (n=40) и сиалоаденэктомированных (n=40) крыс исследовали на 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 8-, 10-й и 12-й неделе эксперимента гистологическим и морфометрическим методами. В ранние сроки (до 6-й недели) после тотальной сиалоаденэктомии обнаружено появление в сперматогенном слое многоядерных сперматид и гибнущих клеток. Обнаружено уменьшение диаметра извитых семенных канальцев и индекса сперматогенеза, которое в большей степени проявляется, но раньше нивелируется у половозрелых крыс.

**Ключевые слова:** сиалоаденэктомия, семенники, сперматогенные клетки

Большие слюнные железы у крыс являются парными органами, которые участвуют в начальных этапах пищеварения, морфогенезе слюнных желез и зубов, периодической деятельности пищеварительного тракта, репарации повреждений кожи и слизистых оболочек, минеральном обмене и др. Свои многочисленные функции большие слюнные железы осуществляют при помощи пищеварительных ферментов ( $\alpha$ -амилаза, дезоксирибонуклеаза, рибонуклеаза, протеазы), факторов роста (эпидермальный фактор роста — ЭФР, фактор роста нервов, основной фактор роста фибробластов, трансформирующий ростовой фактор  $\alpha$  и  $\beta$ , фактор роста гепатоцитов и др.) и гормоноподобных веществ (паротин, сиалорфин). У крыс выработка факторов роста и гормонов слюнными железами в кровь или протоки связана с наличием особого отдела протоковой системы — гранулярных извитых трубок поднижнечелюстных слюнных желез.

Морфологический половой диморфизм поднижнечелюстных слюнных желез у мышей обнаружили А. Lacassagne и А. Chamorro [6], что положило начало изучению взаимного влияния слюнных и половых желез. О. Tsutsumi и соавт. [11] утверждают, что сиалоаденэктомия у мышей приводит к значительному снижению количества всех популяций половых клеток в семенниках и их придатках, тогда как N. Tokida и соавт. [10]

и H. D. Russel и соавт. [8] указывают лишь на умеренное снижение отдельных сперматогенных клеточных популяций в семеннике, вызванное удалением поднижнечелюстных желез у грызунов. Значительное уменьшение массы семенников и их придатков, которое нивелируется при введении экстракта поднижнечелюстных слюнных желез, наблюдается у сиалоаденэктомированных мышей [13]. ЭФР слюнных желез мыши внутриутробно влияет на развитие и функционирование семенников у потомства [13]. Сиалорфин поднижнечелюстных желез модулирует половое поведение крыс и участвует в эректильной функции, а паротин околоушных желез влияет на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов [7].

Таким образом, данные о направленности и степени выраженности влияния больших слюнных желез на морфофункциональное состояние семенников весьма противоречивы. Цель данного исследования — изучить влияние удаления больших слюнных желез на структуру семенников неполовозрелых и половозрелых крыс.

Материал и методы. В работе использовано 240 беспородных крыс-самцов, которые были разделены на две группы: 1-я группа (n=120) — неполовозрелые (20 сут, 45±10 г) и 2-я группа (n=120) — половозрелые (60 сут, 150±20 г). В каждой из указанных групп выделяли: интактных животных — 40 крыс (ИН1 и ИН2, соответственно), ложнооперированных — 40 крыс (ЛО1 и ЛО2 соответственно) и сиалоаденэктомированных — 40 крыс (СЭ1 и СЭ2 соответствен-

### Сведения об авторах:

*Иванова Вера Владимировна* (e-mail: [ivvera92@rambler.ru](mailto:ivvera92@rambler.ru)), Суходоло Ирина Владимировна, кафедра морфологии и общей патологии, Сибирский государственный медицинский университет, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

*Мильто Иван Васильевич*, Буянкина Алина Сергеевна, кафедра биотехнологии и органической химии, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

но). Исследование осуществляли в соответствии с Правилами 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. Проведение исследования одобрено решением локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России № 4253 от 28.09.2015.

Животным групп СЭ1 и СЭ2 проводили полную двустороннюю эктомию околоушных, поднижнечелюстных и подъязычных слюнных желез. Под наркозом (золетил, 5 мг/100 г массы интраперитонеально) на вентральной поверхности шеи после депиляции и обработки операционного поля 3% раствором йода (ИТМК, Россия), делали срединный продольный разрез от тела нижней челюсти до верхнего края грудины. Слева и справа выделяли комплекс поднижнечелюстной и подъязычной желез на ножке и отсекали после наложения лигатуры. Околоушные слюнные железы не имеют компактного строения, поэтому с обеих сторон их выделяли и удаляли дольками. Рану обрабатывали 0,05% водным раствором хлоргексидина (Росбио, Россия) и ушивали лавсаном (Линтекс, Россия). После операции местно применялся стрептоцид (ТФФ, Россия). Ложную операцию крысам групп ЛО1 и ЛО2 проводили аналогичным образом за исключением выделения и эктомии больших слюнных желез. Выведение животных из эксперимента осуществляли путем асфиксии углекислым газом на 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 8-, 10-й и 12-й неделе после операции.

Семенники фиксировали в 10% забуференном (рН 7,4) формалине (БиоВитрум, Россия), промывали водой, обезжировали в изопропанолe (БиоВитрум, Россия) и переносили в парафиновую смесь HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью полуавтоматического микротома (МЗП 01 — Техном, Россия), окрашивали гематоксилином — эозином.

На гистологических препаратах семенников измеряли диаметр извитых семенных канальцев в 50 строго поперечных срезах с использованием программы ImageJ 1.48. Вычисляли индекс сперматогенеза (ИС) 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 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);  $A$  — количество проанализированных канальцев. Индекс вычисляли не менее чем для 50 канальцев каждого среза семенника.

Статистическую обработку результатов производили с помощью программы «SPSS 17.0» (IBM, США). Проверку распределения на соответствие нормальному закону осуществляли с помощью критерия Шапиро—Уилка. Результаты представлены в виде средней и стандартного отклонения ( $\bar{x} \pm \sigma$ ). Для выяснения значимости различий средних значений морфометрических показателей (диаметр извитых семенных канальцев, индекс сперматогенеза) использовали однофакторный дисперсионный анализ для независимых выборок и зависимых выборок с последующим применением критерия Крускала—Уоллеса.

**Результаты исследования.** Сосуды стромы семенников у крыс всех групп были без особенностей. Интерстициальные эндокриноциты у крыс групп ИН1 и ЛО1 на 1–2-й неделе, группы СЭ1 — на 1–3-й неделе, СЭ2 — на 1–2-й неде-

ле эксперимента имели веретеновидную форму, узкие вытянутые гиперхромные ядра, что свидетельствовало об их низкой функциональной активности.

Морфометрические показатели у половозрелых и неполовозрелых ИН и ЛО крыс не имели значимых различий, поэтому приводятся показатели только ИН животных.

У животных группы ИН1 просвет появлялся в отдельных извитых семенных канальцах на 1-й неделе эксперимента. Поздние сперматиды (рис. 1, а) определялись со 2-й недели, сперматозоиды — с 3-й недели эксперимента. У крыс группы СЭ1 просвет в отдельных извитых семенных канальцах появлялся также на 1-й неделе эксперимента. Однако поздние сперматиды обнаруживались с 3-й недели, а сперматозоиды — с 6-й недели эксперимента (см. рис. 1, б). На 3-й неделе после удаления больших слюнных желез среди сперматогенных клеток выявлялись гибнущие. Индекс сперматогенеза у крыс группы СЭ1 на 1-й неделе после сиалоаденэктомии был ниже, чем у группы ИН1 (рис. 2, а).

В составе сперматогенного слоя у животных группы ИН2 на протяжении всего эксперимента обнаруживались все клеточные популяции. В семенниках крыс группы СЭ2 (см. рис. 1, в) сперматозоиды выявлялись лишь с 3-й недели эксперимента. Индекс сперматогенеза в группе СЭ2 был ниже, чем у крыс группы ИН2 на 1-й и 2-й неделе эксперимента.

У ИН неполовозрелых и половозрелых животных многоядерные сперматиды не встречались (см. рис. 2, б). В семенниках крыс группы СЭ1 на 2–4-й неделе после сиалоаденэктомии определялись многоядерные сперматиды. В семенниках крыс группы СЭ2 многоядерные сперматиды были обнаружены на 1-й и 2-й неделе после операции (см. рис. 1, г). Многоядерные сперматиды образовывались в результате нарушения второго мейотического деления.

Сиалоаденэктомия приводила к снижению диаметра извитых семенных канальцев у крыс группы СЭ1 со 2-й по 6-ю неделю и повышению на 12-й неделе после операции по сравнению с показателями у крыс группы ИН1 (см. рис. 2, в). Диаметр извитых семенных канальцев у животных группы СЭ2 на 1-, 2-, 4-й и 8-й неделе после операции был меньше, чем у животных группы ИН2 (см. рис. 2, в).

**Обсуждение полученных данных.** Влияние больших слюнных желез на репродуктивную систему грызунов — вопрос фундаментального характера, но полученные сведения могут найти приложение в диагностике и терапии забо-

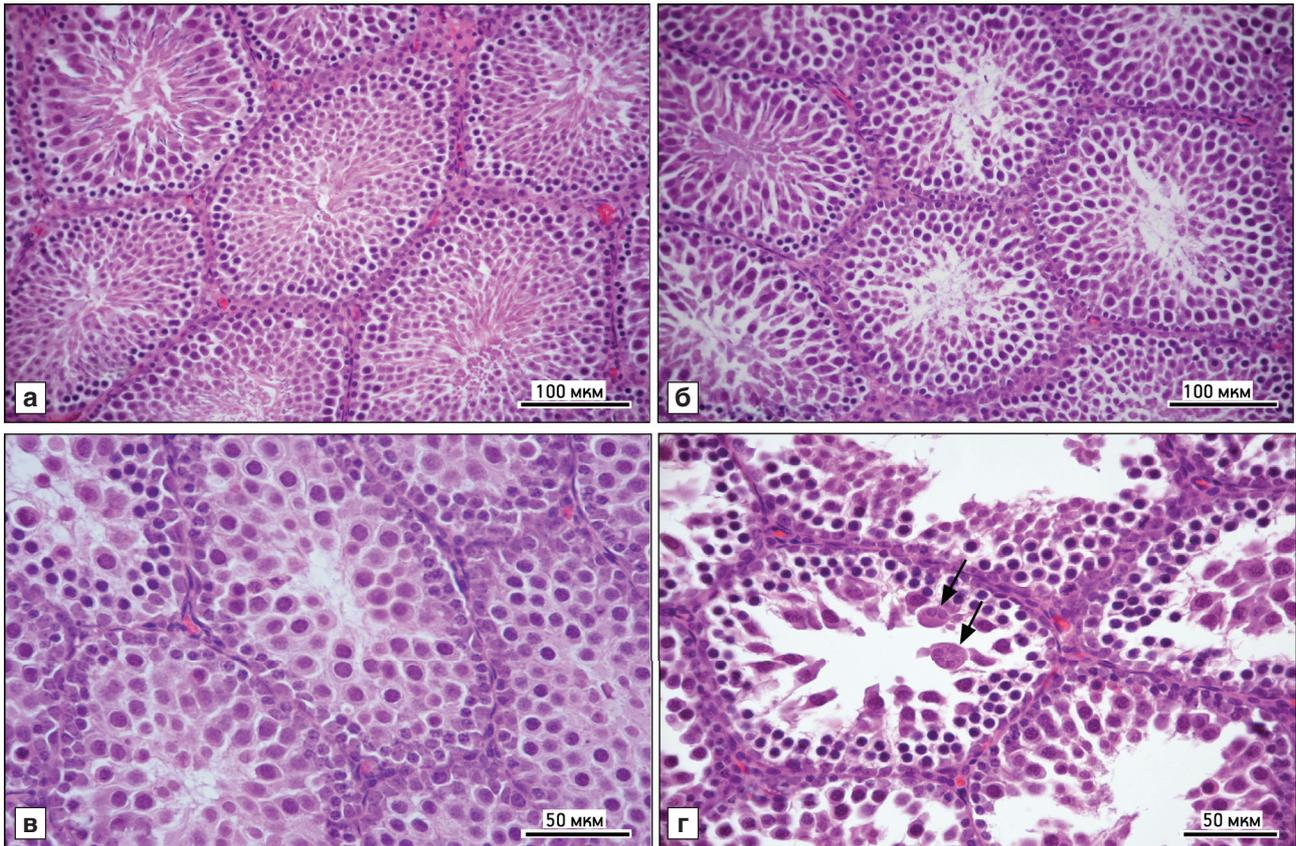


Рис. 1. Семенники неполовозрелых (а, б) и половозрелых (в, г) крыс.

а — интактные животные, 4 нед: в семенных канальцах видны поздние сперматиды, в просвете — сперматозоиды; б — 4-я неделя после сиалоаденэктомии, сперматозоиды в извитых семенных канальцах отсутствуют; в — 2-я неделя после сиалоаденэктомии; просвет имеется в отдельных извитых семенных канальцах; сперматозоиды не обнаруживаются; г — 1-я неделя после сиалоаденэктомии; многоядерные сперматиды (стрелка). Окраска гематоксилином — эозином

леваний мужской репродуктивной системы человека. К примеру, у пациентов с гипогонадизмом [2] и хроническим простатитом [1] выявлено увеличение околоушных слюнных желез, что указывает на возможную морфофункциональную связь половых и слюнных желез человека.

Сиалоаденэктомия вызывает одинаковые по направленности изменения в семенниках половозрелых и неполовозрелых животных, что, вероятно, связано с уменьшением концентрации биологически активных факторов больших слюнных желез, в частности ЭФР, в плазме крови. Поднижнечелюстные железы у крыс являются главным источником ЭФР, рецепторы которого обнаруживаются на sustentоцитах (клетки Сертоли), интерстициальных эндокриноцитах (клетки Лейдига), а также сперматоцитах, сперматидеях и сперматозоидах [9, 11, 14].

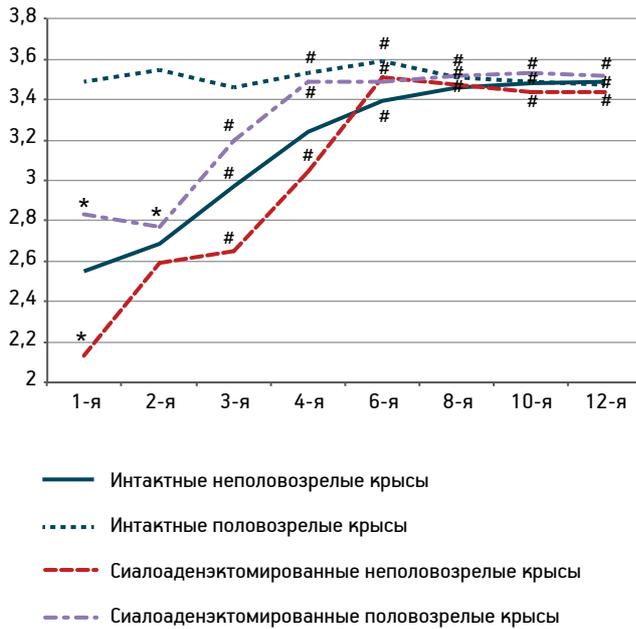
В отличие от представленных нами результатов, S.Zhang и соавт. [15] свидетельствовали, что структура семенников половозрелых мышей после сиалоаденэктомии остается нормальной, хотя фертильность животных при этом снижается. Однако стрессорное воздействие на семенни-

ки мышей с удаленными поднижнечелюстными железами способствует появлению в них морфологических признаков повреждения, которые не наблюдаются у животных без удаления больших слюнных желез [3].

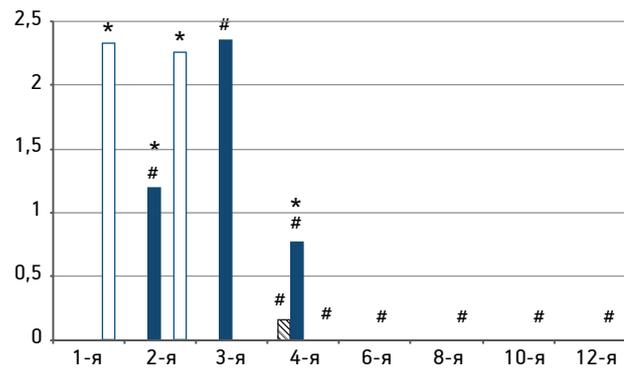
У крыс ЭФР эффективен при лечении бесплодия, индуцированного варикоцеле [3], а также снижает число гибнущих сперматогенных клеток при крипторхизме [5]. ЭФР способствует восстановлению строения и функции семенников у крыс после перекручивания семенного канатика [12]. По данным R.W.Wong и соавт. [14], гиперэкспрессия ЭФР у трансгенных мышей приводит к гипосперматогенезу.

Изменения сперматогенных клеток после сиалоаденэктомии значительно выражены у неполовозрелых крыс, что можно объяснить вовлеченностью слюнных желез в процесс дифференцировки органов репродуктивной системы самцов посредством модуляции активности рецепторов андрогенов [4].

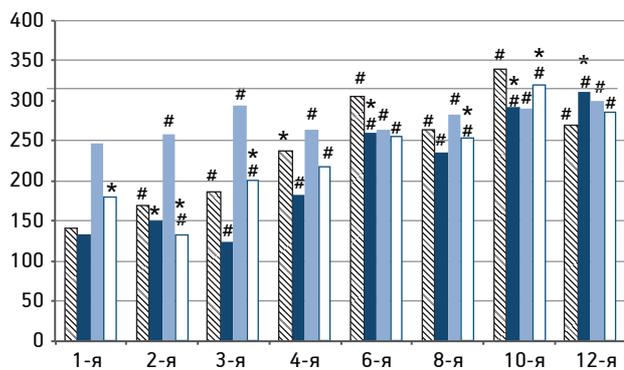
Изменения морфометрических показателей у сиалоаденэктомированных неполовозрелых животных нивелируются к 10-й неделе, поло-



а



б



в

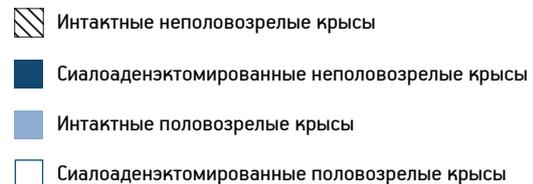


Рис. 2. Индекс сперматогенеза (а), количество многоядерных сперматид в 1 мм<sup>2</sup> среза семенников (б), диаметр извитых семенных канальцев (мкм) (в) у неполовозрелых и половозрелых крыс.

По оси абсцисс — срок эксперимента (неделя); по осям ординат — соответствующие исследованные показатели.

\* Отличие от аналогичного показателя у животных интактной группы; # отличие показателя внутри группы от его значения на 1-й неделе,  $P < 0,001$

возрелых крыс — к 8-й неделе эксперимента. Возможно, это объясняется компенсаторно-приспособительными механизмами, в частности, увеличением синтеза биологически активных факторов больших слюнных желез другими источниками в организме крыс (слизистая оболочка желудка, двенадцатиперстной кишки, эпителиоциты поджелудочной железы).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амерханов М. В. Клиника, диагностика и лечение сиалоаденоза у больных с хроническим простатитом (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2002.
2. Степаненко Р. С. Оценка состояния слюнных желез у мужчин при гипогонадизме и его лечении: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2014.
3. Cheng D., Zheng X.M., Li S.W. et al. Effects of epidermal growth factor on sperm content and motility of rats with surgically induced varicoceles // *Asian. J. Androl.* 2006. Vol. 8, № 6. P. 713–717.
4. Gupta C., Chandorkar A., Nguyen A.P. Activation of androgen receptor in epidermal growth factor modulation of fetal mouse sexual differentiation // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996. Vol. 123, № 1. P. 89–95.
5. Kurokawa S., Kojima Y., Mizuno K. et al. Effect of epidermal growth factor on spermatogenesis in the cryptorchid rat // *J. Urol.* 2005. Vol. 174, № 6. P. 2415–2419.
6. Lacassagne A., Chamorro A. Reaction a la testosterone de la glande soul-maxillaire, atrophiee consecutivement a l'hypophysectomie chez la souris // *C.R. Soc. Biol.* 1940. Vol. 134. P. 223–234.
7. Rougeot C., Rosinski-Chupin I., Mathison R., Rougeon F. Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides // *Peptides.* 2000. Vol. 21, № 3. P. 443–455.
8. 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.

9. Suarez-Quian C.A., Niklinski W. Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis // *Biol. Reprod.* 1990. Vol. 43, № 6. P. 1087–1097.
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. Uguralp S., Bay Karabulut A., Mizrak B. et al. The effect of sustained and local administration of epidermal growth factor on improving bilateral testicular tissue after torsion // *Urol. Res.* 2004. Vol. 32. P. 323–331.
13. Walvekar M. V., Pillai M. M. Endocrine relation between submandibular gland and testes // *J. Cell. Tiss. Res.* 2008. Vol. 8, № 2. P. 1411–1416.
14. Wong R. W., Kwan R. W., Mak P. H. et al. Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 24. 18297–18301.
15. Zhang S., Zeng Y., Qu J. et al. Endogenous EGF maintains Sertoli germ cell anchoring junction integrity and is required for early recovery from acute testicular ischemia/reperfusion injury // *Reproduction.* 2013. Vol. 145, № 2. P. 177–189.

Поступила в редакцию 18.06.2016  
Получена после доработки 20.12.2016

## EFFECT OF TOTAL SIALOADENECTOMY ON THE STRUCTURE OF RAT TESTIS

V.V.Ivanova<sup>1</sup>, I.V.Mil'to<sup>1,2</sup>, I.V.Sukhodolo<sup>1</sup>,  
A.S.Buyankina<sup>2</sup>

The effect of the major salivary gland removal on the structure of the testes was studied in immature (n=120) and adult (n=120) rats. Testes of intact (n=40), sham-operated (n=40) and sialoadenectomized (n=40) animals were examined at weeks 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 of the experiment by histological and morphometric methods. In the early stages (up to 6 weeks) after total sialoadenectomy, the multinucleated spermatids and dying cells were observed in the seminiferous epithelium. The diameter of the convoluted seminiferous tubules and spermatogenesis index were decreased. These changes were more pronounced but sooner leveled in mature rats.

**Key words:** *submandibular gland, testis, seminiferous epithelium*

<sup>1</sup> Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk; <sup>2</sup> Department of Biotechnology and Organic Chemistry, Tomsk National Research Polytechnic University