

Г. Л. Снигур, А. С. Кучерявенко

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ,
кафедра биологии;
ЦМИТ «Биомедицина»

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ДЕФИЦИТЕ МАГНИЯ

УДК:616-003.93:611.631.3:612.086.3

Гистологическим и иммуногистохимическим методами показано повышение пролиферативной активности эпителиоцитов в фазе размножения сперматогенеза на срезах семенников крыс с дефицитом магния по сравнению со срезами интактных животных в 2,9 и 4,6 раза соответственно. Проведенные исследования позволяют предположить, что увеличение пролиферации эпителиоцитов при дефиците магния в организме крыс является следствием адаптации репродуктивной системы к данному состоянию.

Ключевые слова: магний-дефицитная диета, сперматогенез, эпителиоциты, пролиферативная активность, белок Ki-67.

G. L. Snigur, A. S. Kucheryavenko

FEATURES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF RAT TESTES EPITHELIAL CELLS IN MAGNESIUM DEFICIENCY

Histological and immunohistochemical methods have shown an increase in the proliferative activity of epithelial cells in the phase of reproduction of spermatogenesis on sections of the testes of rats with magnesium deficiency compared to sections of intact animals by 2.9 and 4.6 times, respectively. The studies carried out suggest that the increase in the proliferation of epithelial cells in the presence of magnesium deficiency in rats is a consequence of the adaptation of the reproductive system to this state.

Key words: magnesium-deficient diet, spermatogenesis, epithelial cells, proliferative activity, Ki-67 protein.

Микро и макро-элементы играют важную роль в организме человека. Одним из ключевых макроэлементов является магний, который входит в состав абсолютно всех тканей и клеток и принимает участие в важнейших обменных процессах [3]. Дефицит этого макроэлемента может привести к различным заболеваниям таким, как ишемическая болезнь сердца, гипертония, заболевания нервной системы, язвенная болезнь желудка и др. [2, 4, 7]

В настоящее время в литературе имеются данные о влиянии магния на пролиферативную активность клеток репродуктивной системы [1]. Одним из маркеров для определения так называемой «фракции роста клеточной популяции» является белок Ki-67, по экспрессии которого можно исследовать пролиферативную активность. Ki-67 был впервые идентифицирован как антиген в ядрах клеток лимфомы Ходжкина. Ki-67 – это ядерный антиген, ген которого расположен на длинном плече 10 пары хромосомы. Данный белок экспрессируется во всех фазах митоза и в синтетическом периоде [6].

Функции белка Ki-67 хорошо описаны на молекулярном уровне, что дает возможность

использования данного белка в качестве достоверного маркера для выявления всего пула пролиферирующих клеток [5]. Однако структурно-функциональные изменения семенников при дефиците магния изучены недостаточно.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью настоящего исследования явилось изучение пролиферативной активности клеток в фазе размножения сперматогенеза у крыс, находящихся на магний-дефицитной диете.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 20 нелинейных половозрелых крысах-самцах, массой 250–300 г.

Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

Перед началом исследования все животные были разделены на 2 группы: контрольная и опытная. Контрольная группа ($n = 10$) получала полноценное питание, включающее кормовую смесь для содержания лабораторных животных (ООО «ТПК Альянс», Россия), зернопродукты, сочные корма (овощи и травы) и отстоянную воду. Опытная группа ($n = 10$) с целью моделирования алиментарного дефицита магния в течение 12 недель получала диету с добавлением полиминеральной смеси без солей магния АIN-76 (MPBiomedicals, Ойо, США) и очищенную от солей воду. При этом обе группы животных содержались в одинаковых условиях. Ежедневно проводили оценку общего состояния и измеряли массу тела (г). Через 12 недель проводили измерение уровня магния в плазме крови и эритроцитах спектрофотометрическим методом по цветной реакции с титановым желтым [1].

Для проведения гистологического исследования забор материала проводили путем вырезания продольных и поперечных фрагментов, включающих все оболочки семенников крысы. Полученный материал фиксировали в 4%-м растворе нейтрального забуференного формалина ($pH = 7,4$) в течение 24 часов. Далее производили заливку в парафиновые блоки по общепринятым гистологическим методикам с последующим изготовлением парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм и окраской гематоксилином и эозином.

Гистологическое исследование проводили путем подсчета общего количества клеток сперматогенного эпителия.

Иммуногистохимическое исследование выполняли с первичными кроличьими моноклональными антителами к белку Ki-67 [клон SP6], с детекцией хромогеном-диаминобензидином, по общепринятым методикам. Характер иммуногистохимической реакции оценивали визуально и определяли удельное количество позитивно окрашенных клеток стандартизирован-

ными методами морфометрии в иммуногистохимии (Dabbs D. J., 2018). Оценку пролиферативной активности производили путем подсчета удельного количества Ki-67-позитивных клеток к общему количеству клеток сперматогенного эпителия (%).

Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили в случайных полях зрения с помощью микроскопа «AxioScope» (CarlZeiss, Германия). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft office Excel 2007 (Microsoft, США) и GraphPad (тесты).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования была выполнена оценка пролиферативной активности клеток в зоне размножения семенников крыс гистологическим и иммуногистохимическим методами.

При гистологическом анализе зоны размножения семенников крыс на срезах в контрольной группе количество ядер клеток сперматогенного эпителия составило $13816 \pm 690,8$. На срезах животных с дефицитом магния данный показатель был равен $40371 \pm 310,5$, что достоверно превосходило группу интактного контроля на 65,8 % (см. табл., рис. 1).

С целью уточнения полученных данных пролиферативная активность клеток зоны размножения семенников была изучена более избирательным иммуногистохимическим методом. В результате на срезах обеих групп животных определялась Ki-67-позитивная ядерная экспрессия антигена преимущественно в зоне размножения. На микропрепаратах интактных животных Ki-67-позитивные клетки определялись в количестве $7086 \pm 354,3$, а на срезах семенников магни-дефицитных крыс уровень составил $32684 \pm 251,4$, что статистически значимо на 78,4 % превышало значение контрольных данных (см. табл., рис. 2).

Морфометрические показатели пролиферативной активности клеток в зоне размножения семенников крыс, находящихся на магни-дефицитной диете гистологическим методом и иммуногистохимическим методом с антителами к белку Ki-67 ($M \pm m$) ($n = 10$)

Экспериментальные группы	Общее количество ядер клеток ($M \pm m$)	Общее количество Ki-67 позитивных клеток ($M \pm m$)	Индекс пролиферации, %
Контрольная группа	$13816 \pm 690,8$	$7086 \pm 354,3$	51,28
Опытная группа	$40371 \pm 310,5^*$	$32684 \pm 251,4^*$	80,96

* Данные достоверны относительно контроля. $P < 0,05$.

Примечание: n -число микропрепаратов в группе.

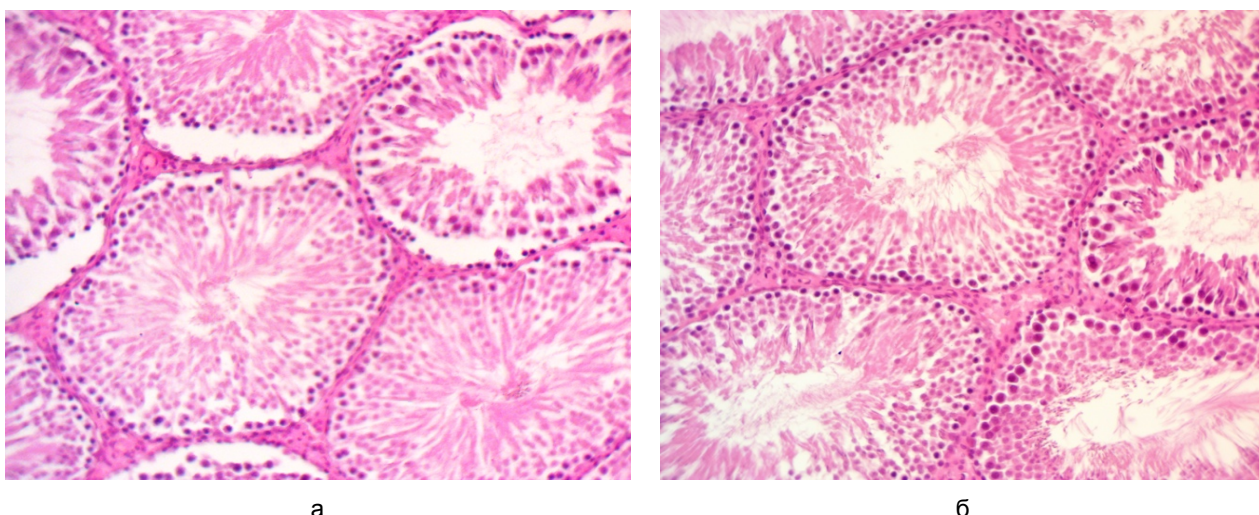


Рис. 1. Микропрепараты срезов семенников intactных крыс (а) и крыс с дефицитом магния (б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400

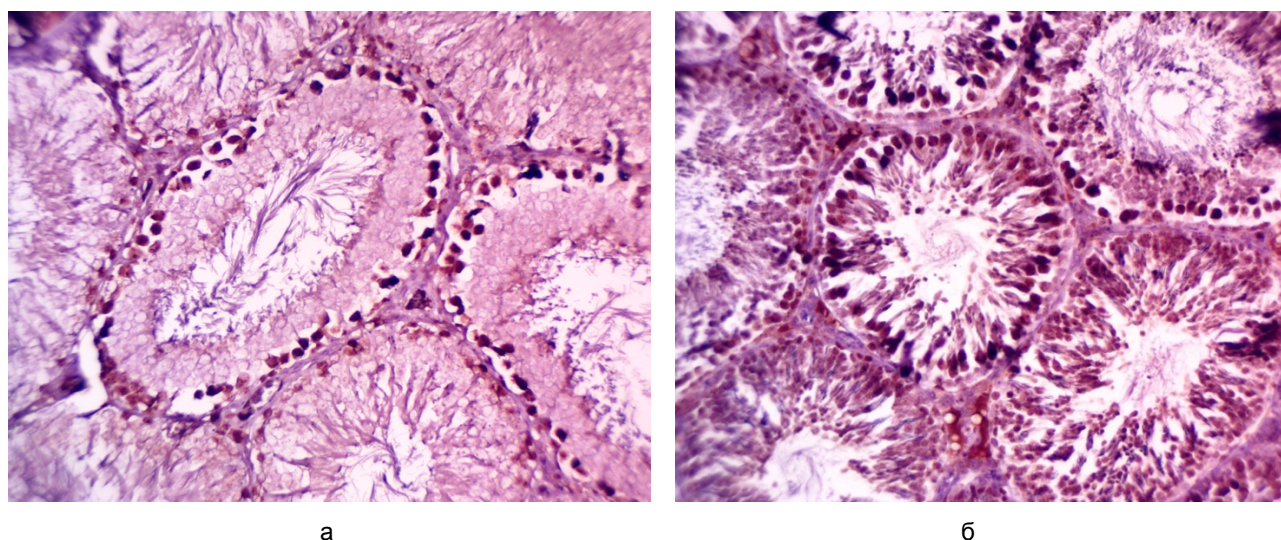


Рис. 2. Микропрепараты срезов семенников intactных крыс (а) и крыс с дефицитом магния (б). Иммуногистохимическая реакция с антителами к протеину Ki-67. Докраска гематоксилином. Ув. ×400

При расчете индекса пролиферативной активности его среднее значение в контрольной группе животных составило 51,28 %, во второй экспериментальной группе – 80,96 %, что свидетельствовало о достоверном увеличении клеток, находящихся на разных фазах митоза по отношению к группе intactных животных (см. табл.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что при гистологическом и иммуногистохимическом (с использованием маркера пролиферации К-67) методах изучения пролиферативной активности клеток зоны размножения семенников крыс, находившихся в течение 12 недель на магний-дефицитной диете,

количество ядер эпителиоцитов достоверно в 2,9 и 4,6 раза соответственно превосходило данный показатель на срезах intactных групп.

Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие магния в организме крыс повышает адаптационные механизмы репродуктивной системы к данному состоянию, что проявляется увеличением пролиферативной активности эпителиоцитов в семенниках животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Андреева, Ю. В.** Влияние дефицита магния на репродуктивное здоровье женщин / Ю. В. Андреева, Н. В. Толмачёва // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 6. – С. 13 – 18. – Текст : непосредственный.

2. Нарушение обмена магния и калия и его фармакологическая коррекция / А. А. Спасов, И. Н. Иежица, М. В. Харитонова, А. А. Желтова // Вестник Оренбургского гос. ун-та. – 2011.– № 15 (134). – С. 131 – 135. – Текст : непосредственный.
3. **Спасов, А. А.** Магний в медицинской практике / А. А. Спасов. – Волгоград, 2000. – 272 с. – Текст : непосредственный.
4. **Талибов, О. Б.** Магний в кардиологической практике / О. Б. Талибов, В. В. Городецкий // Терапевт – 2006. – № 10. – С. 46 – 55. – Текст : непосредственный.
5. **Bruno, S.** Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells / S. Bruno, Z. Darzynkiewicz // Cell Proliferation. – 1997. – Vol. 25 (1). – P. 31 – 40. – Direct text.
6. **Scholzen, T.** The Ki-67 protein: from the known and the unknown / Scholzen T., Gerdes J. // J. Cell Physiol. – 2000. – Vol. 182 (3). – P. 311 – 322. – Direct text.
7. **Sontia, B.** Role of magnesium in hypertension / B. Sontia, R. M. Touyz // Arch. Biochem. Biophys. – 2007. – 1. – Vol. 458 (1). – P. 33 – 39. – Direct text.