



1930

В. С. Скрипкин, Р. Т. Сулайманова,  
А. Н. Квочко, Р. М. Хайруллин

**МОРФОЛОГИЯ  
И ИММУНОГИСТОХИМИЯ  
СЕМЕННИКОВ ЖИВОТНЫХ  
ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ  
В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

ISBN 978-5-9596-1922-0

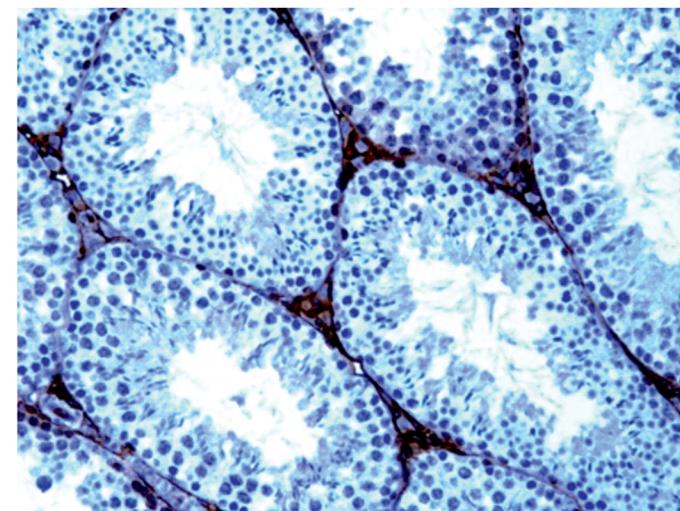


9 785959 619220

В. С. Скрипкин, Р. Т. Сулайманова,  
А. Н. Квочко, Р. М. Хайруллин

**МОРФОЛОГИЯ  
И ИММУНОГИСТОХИМИЯ  
СЕМЕННИКОВ ЖИВОТНЫХ  
ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ  
В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

Методические рекомендации



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЧАСТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ УНИВЕРСИТЕТ «РЕАВИЗ»

В. С. Скрипкин, Р. Т. Сулайманова,  
А. Н. Квочко, Р. М. Хайруллин

**МОРФОЛОГИЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЯ  
СЕМЕННИКОВ ЖИВОТНЫХ  
ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ  
В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

*Методические рекомендации*

Ставрополь  
«АГРУС»  
2023

УДК 636:611.631(076)

ББК 48.7я73

М79

**Авторский коллектив:**

доктор биологических наук, профессор *В. С. Скрипкин*;  
кандидат биологических наук, доцент *Р. Т. Сулайманова*;  
доктор биологических наук, профессор, профессор РАН *А. Н. Квочко*;  
доктор медицинских наук, профессор *Р. М. Хайруллин*

**Рецензенты:**

директор департамента ветеринарной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», доктор ветеринарных наук, профессор *Ю. А. Ватников*;  
главный научный сотрудник лаборатории геномной селекции и репродуктивной криобиологии ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», доктор биологических наук *А. Ю. Криворучко*;  
профессор кафедры паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С. Н. Никольского ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», доктор биологических наук, доцент *В. М. Шпыгова*

**Морфология** и иммуногистохимия семенников животных при введении М79 эстрогенов в пренатальном периоде : методические рекомендации / В. С. Скрипкин, Р. Т. Сулайманова, А. Н. Квочко, Р. М. Хайруллин. – Ставрополь : АГРУС Ставропольского гос. аграрного ун-та, 2023. – 40 с.

ISBN 978-5-9596-1922-0

Представлены данные собственных исследований авторов, способа моделирования воздействия повышенного уровня стероидных гормонов на семенники потомства белых беспородных лабораторных мышей путем введения в материнский организм различных доз препарата эстрогенного ряда синэстрола в критический период закладки органов. Дана оценка морфофункциональных и иммуногистохимических показателей семенников потомства при пренатальном воздействии эстрогенного препарата синэстрола.

Предназначены для профильных научных и педагогических работников, студентов и слушателей курсов повышения квалификации по специальностям «Зоотехния», «Звероводство и охотоведение» и «Ветеринария» и зооветеринарных специалистов.

**УДК 636:611.631(076)**

**ББК 48.7я73**

*Рекомендованы к изданию Научно-методическим советом при Федеральном учебно-методическом объединении по укрупненной группе специальностей и направлению подготовки высшего образования «Ветеринария и зоотехния» (протокол № 37 от 16 мая 2023 г.).*

*Рекомендованы к изданию учебно-методической комиссией факультета ветеринарной медицины и биотехнологического факультета ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» (протокол № 6 от 15 мая 2023 г.).*

ISBN 978-5-9596-1922-0

© ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| Список сокращений и условных обозначений.....  | 3  |
| Введение .....   | 4  |
| 1.Строение семенника.....  | 7  |
| 2.Морфометрическая и иммуногистохимическая организация для<br>исследования семенников потомства.....   | 8  |
| 3.Морфофункциональное состояние семенников потомства белых<br>беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном<br>внутримышечном введении синэстрола..... | 10 |
| 4.Оценка морфологии семенников потомства белых беспородных<br>лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном<br>введении синэстрола.....             | 14 |
| 5.Иммуногистохимический анализ семенников потомства белых<br>беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном<br>внутримышечном введении синэстрола ..... | 19 |
| 6.Заключение .....   | 22 |
| 7.Список литературы.....   | 24 |
| 8.Приложение .....   | 30 |

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ИГХ — иммуногистохимия, иммуногистохимический

Bcl-2 — маркер ингибитор апоптоза

Ki-67 — маркер пролиферирующих клеток

p53 — ядерный маркер апоптоза

## **ВВЕДЕНИЕ**

Благополучие постнатального развития и репродуктивная активность во взрослой жизни зависит от условий внутриутробного состояния организма. Вредные факторы внешней среды, влияние экзогенных гормонов в пренатальный период закладки и развития гонад являются ключевыми регуляторами репродуктивного здоровья потомства (Никитин А. И. 2016; Курило Л. Ф. 2011).

Особое внимание в научной индустрии уделяется гормональному балансу и вопросу пренатального воздействия гормонов и их аналогов на последующее поколение. Беременность вызывает физиологическое повышение гормонов, действие которых влияет не только на организм матери, но и влечёт за собой изменения в функциональном развитии у формирующегося плода. Высокая концентрация гормонов и их производных в материнской крови не зависит от пола развивающегося плода (Милованова А.П. 2006).

У потомства при патогенном воздействии веществ различной природы истощаются компенсаторные возможности, приводящие к невозможности распада субклеточных структур, нарушению функций, дистрофическому процессу и гибели клеток (Сизоненко М.Л. 2015).

Пренатальный стресс вызывает комплекс разнообразных морфологических, нейрохимических, эндокринных, метаболических изменений, проявляющихся в постнатальной жизни (Резников А. Г. и др., 2004).

В последние годы получены результаты, позволяющие надеется на разработку новых эффективных способов предсказания клинического течения и терапии новообразования, основанных на высокотехнологичные и более точные методы анализа (Коржевский Д.Э. и др., 2014).

В сфере ветеринарной деятельности одним из современных методов диагностики заболеваний животных является применение иммуногистохимического метода исследования. Данный метод используется как при диагностических, так и в научных разработках при дифференциальной диагностике заболеваний опухолевой и не опухолевой природы (George L. Kumar 2011; Даренская А.Д. и др., 2019).

Большое внимание уделяется изучению молекулярно-биологическим маркерам, характеризующие пролиферацию – белок Ki-67 (Степанова Е.В. и др., 2011).

В изучении регуляции процесса апоптоза занимают молекулярные белки семейства Bcl-2, которые отражают синтетические процессы, протекающие в клетках и тканях органов животных (Фролов М.А. и др., 2013; Huang X. et al., 2001; Mooney S.M. et al., 2000).

ИГХ маркер p53, который отвечает за «охрану» клеток: либо индуцирует репарацию повреждений, либо останавливает клеточный цикл, либо стимулирует клетки с измененным геномом к апоптозу (Киселев, Ф. Л. 2014).

Потеря экспрессии ИГХ маркера p53 приводит к существенному снижению миграционной способности самых разных типов клеток — нормальных фибробластов, кератиноцитов, макрофагов, клеток рака легкого и ободочной кишки. С другой стороны, повышение активности p53, вызываемое, в частности, рядом стрессов, наоборот, увеличивает миграционную способность клеток (Sablina A.A. et al., 2003; Kopnin P. V. et al., 2008).

Пренатальное влияние эстрогенов на ранних стадиях антенального развития, в особенности периода закладки репродуктивных органов приводит к нарушению разнообразных морфологических изменений в органах, проявляющихся в постнатальной жизни у разных видов животных, особенно при проведении искусственного осеменения (Резников А.Г. и др., 2004; Ткачев А.В. и др., 2022; Ткачев А.В. и др., 2019).

Моделирование патологических состояний у лабораторных животных является важным разделом ветеринарной медицины, поскольку от качества и воспроизводимости модели зависит не только обоснованность фундаментальных выводов о механизмах развития заболеваний, но и результаты доклинических испытаний медикаментозных препаратов (Тишевская, Н. В. И др. 2017).

## 1. СТРОЕНИЕ СЕМЕННИКА

Семенник — является одной из самых сложных, тесно взаимосвязанных систем в организме (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Снаружи семенник покрыт серозной оболочкой — брюшиной; под ней находится оболочка из плотной соединительной ткани, называемая белочной оболочкой и получившая свое название из-за большого количества в ней волокнистой ткани. Ее внутренний слой благодаря обилию кровеносных сосудов называют сосудистой оболочкой (Артифексов, и др., 2007; Бойчук, Н.В. и др., 1995).

Капсула заднего края семенника сильно утолщена и распространяется вглубь железы с образованием прослоек. Эти неполные перегородки находятся преимущественно в центральной части железы, вместе с утолщенной частью капсулы, от которой они отходят, их называют тестикулярным средостением (Самусев Р.П. 2011; Russell L.D. et al., 1990).

Средостение каждого яичка пронизано протоками, выстланными эпителием. Эти протоки образуют сеть яичка. Все семенные канальцы яичка открываются в полость протоков сети (Бойчук Н.В. и др., 1995). От средостения внутрь семенника отходят перегородки, которые разделяют семенник на дольки конической формы. Каждая долька конической формы содержит от одного до четырех извитых семенных канальцев (Кузнецова Т.Е. и др., 2006; Сизоненко М.Л. 2015).

Между канальцами в семеннике расположена рыхлая соединительная ткань стромы. В ней содержатся клетки Лейдига, осуществляющие эндокринную регуляцию. Генеративная функция (сперматогенез) осуществляется в извитых семенных канальцах, их стенка представлена специализированным однослойным эпителием, часто называемым сперматогенным. Эпителий состоит из двух популяций клеток: сперматогенных клеток (сперматогонии типа А и В, сперматоциты первого и второго порядков, сперматиды и сперматозоиды) и эпителиальных поддерживающих клеток (суспендоциты, клетки Сертоли)

(Багацька, Н.В. 2004; Потапов, С.Н. 2011; Рузен-Ранге, Э. 1980; Сизоненко, М.Л. 2015).

Эпителиосперматогенный слой извитого семенного канальца яичка имеет две основные популяции клеток (гаметы с их предшественниками на различных стадиях дифференцировки и поддерживающие клетки Сертоли, или сустентоциты находящиеся в тесной морфофункциональной связи. Эпителиосперматогенный слой чрезвычайно чувствителен к повреждающим действиям (Малишкіш, І.Н. 2000; Arbuckle T.E. et al., 1999; Hess R.A. et al., 2008).

При различных экспериментальных исследованиях (интоксикациях, авитаминозах, гипотрофии и других состояниях, особенно при воздействии ионизирующего излучения) на гонадах мужской половой системы наблюдается атрофия сперматогенного эпителия, ослабление, прекращение сперматогенеза (Мамина, В.П. и др., 2001; Нарбутова, Т.Е. 2011; Камилов, Ф.Х. и др., 2002).

## **2.МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕМЕННИКОВ ПОТОМСТВА**

Исследование проведены с 2014 по 2020 год в условиях кафедры гистологии ФГБОУ ВО «БГМУ» Министерства здравоохранения РФ. Эксперимент выполнен на потомстве белых беспородных лабораторных мышей, матерям которых на 11 сутки беременности внутримышечно однократно вводили экспериментальные дозы синтетического аналога эстрогена синэстрола в виде 2% масляного раствора. Полученное потомство разделили на группы по 5 животных в каждой: интактная группа – без воздействия, первой экспериментальной группе вводили - синэстрол в дозе 25 мкг/кг «С-25», второй экспериментальной групп вводили – синэстрол в дозе 40 мкг/кг «С-40». Расчеты эффективности доз препарата производили в соответствии с коэффициентами для перерасчета доз веществ в мкг/кг для мышей (Арзамасцев, Е.В. и др. 2005; Гуськова, Т.А. 2010; Хабриев, Р.У. 2005).

Вывод из эксперимента лабораторных животных производили в фазу диэструса на 90 сутки. Эстральный цикл у потомства определяли с

использованием влагалищных мазков, окрашенных по критериям М.С. Cora (Cora M.C. et al., 2015). Исследованию подвергались семенники потомства лабораторных мышей, фиксация и гистологическая проводка осуществлялась по стандартной схеме. Подсчет структур семенников потомства производился под иммерсионным объективом на стандартных полях зрения 90× (Автандилов, Г.Г. 1990; Семченко, В. В. 2006).

Экспериментальная часть исследования выполнена в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков семенников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Иммуногистохимическим методом определяли маркеры пролиферативной активности белка Ki-67 (Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen. Клон MIB-1; разведение: 1:300); маркер ингибитора апоптоза Bcl-2 (Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein. Клон N-19, разведение: 1:300); маркер p53 - ядерный антиген (Mouse Monoclonal Antibody p53 Protein, Клон fl-393-G; разведение: 1:300). Использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия) для мыши по рекомендации производителя Santa Cruz Biotechnology (США). Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). Оценку окрашенных препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica, в 10 полях зрения каждого образца при увеличении ×100 производили подсчет среднего числа иммуннопозитивных клеток с положительной реакцией. Среднее число положительных к антигенам клеток вычисляли соотношением с клетками, в которых эти антигены не определялись (на 100 просчитанных клеток) (Автандилов, Г.Г. 1990; Семченко, В. В. 2006).

### **3.МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕМЕННИКОВ ПОТОМСТВА БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОМ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ СИНЭСТРОЛА**

Морфометрических анализ показателей извитых семенных канальцев потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синтетического препарата синэстрол показал (таблица 1) отсутствие значимых различий количества извитых семенных канальцев в одном поле зрения в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг по сравнению с интактной группой. В показателе площади поперечного сечения извитого семенного канальца незначительное уменьшение произошло только в группе С-25 мкг/кг по сравнению с интактной группой. Показатель диаметра извитых семенных канальцев в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг незначительно уменьшился, но значимых различий не показал по сравнению с интактной группой. Показатель толщины сперматогенного эпителия незначительно увеличился в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг, но значимых различий не показал по сравнению с группой интакта. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества клеток Сертоли в эпителии извитого семенного канальца на 11,3% ( $p \leq 0,05$ ) и 16,3% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Значимое уменьшение количества сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца произошло в экспериментальной группе С-40 мкг/кг на 7,6% ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с интактной группой. Показатель количества сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца незначительно уменьшился в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг, но значимых различий не показал по сравнению с группой интакта. В показателе количества сперматид в эпителии извитого семенного канальца значимых различий не отмечено. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически

значимое уменьшение количества сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца на 10,9% ( $p \leq 0,05$ ) и 9,5% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно. Уменьшение площади ядер клеток Лейдига наблюдались в обеих экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг по сравнению с группой интакта на 12,5% и 26,6% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Таблица 1.

Морфометрические показатели извитых семенных канальцев потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном введении синтетического препарата синэстрол

| Показатели  | Интактная          | С-25 мкг/кг        | С-40 мкг/кг        |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| Среднее количество извитых семенных канальцев в одном поле зрения                 | 28,8±2,6           | 28,4±2,1           | 26,4±1,1           |
| Средняя площадь поперечного сечения извитого семенного канальца, мкм <sup>2</sup> | 1696,20±<br>562,39 | 1515,61±<br>280,17 | 1651,23±<br>442,11 |
| Средний диаметр извитых семенных канальцев, мкм                                   | 22,38±4,36         | 19,99±2,98         | 21,56±4,42         |
| Средняя толщина сперматогенного эпителия, мкм                                     | 4,41±0,86          | 4,45±0,47          | 4,71±0,53          |
| Среднее количество клеток Сертоли в эпителии извитого семенного канальца          | 20,8±1,9           | 18,4±1,1*          | 17,4±1,1*          |
| Среднее количество сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца          | 26,4±1,1           | 25,4±1,1           | 24,4±1,1*          |
| Среднее количество сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца           | 32,6±2,1           | 31,0±1,6           | 30,2±1,3           |
| Среднее количество сперматид в эпителии извитого семенного канальца               | 28,6±1,7           | 27,2±0,8           | 28,0±1,0           |
| Среднее количество сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца          | 196,6±5,3          | 175,0±3,8*         | 178,0±4,2*         |
| Средняя площадь ядер клеток Лейдига, мкм <sup>2</sup>                             | 6,72±1,78          | 5,88±1,43          | 4,93±1,31*         |

Примечание: \* — в сравнении с интактной группой выявлены различия со статистической значимостью  $p \leq 0,05$ .

Генеративная функция семенников потомства лабораторных мышей оценивалась по усредненным параметрам площади поперечного сечения и

диаметра больших и малых извитых семенных канальцев, толщины сперматогенного эпителия, площади ядер клеток Лейдига.

При гистологической оценке среза семенников интактной группы мышей, окрашенного гематоксилином и эозином, морфофункциональных изменений не выявлено: яичко типичного дольчатого строения, состоит из многочисленных извитых семенных канальцев, средний диаметр которых равен  $22,38 \pm 4,36$  мкм. Пространство между канальцами заполняет интерстиций, представленный прослойками рыхлой волокнистой соединительной ткани, сосудами и клетками Лейдига. Средняя площадь ядер клеток Лейдига соответствует значениям  $6,72 \pm 1,78$  мкм<sup>2</sup>, а средняя площадь извитых семенных канальцев составляет  $1696,20 \pm 562,39$  мкм<sup>2</sup>.

Стенки канальцев выстланы с внутренней стороны сперматогенным эпителием, с внешней — собственной оболочкой. Сперматогенный эпителий расположен на базальной мембране и включает два типа клеток: клетки Сертоли и сперматогенные клетки на разных стадиях созревания (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды). Собственная оболочка представлена сетью коллагеновых волокон, образующих базальный слой, и одним слоем миоидных клеток, составляющих миоидный слой, средняя толщина которого равна  $4,41 \pm 0,86$  мкм.

Таким образом, при морфологической оценке среза семенника, окрашенного гематоксилином и эозином, потомства лабораторных мышей изменений в структуре яичка не выявлено: сперматогенез в извитых семенных канальцах активный, половые клетки без количественных изменений, явлений слущивания незрелых половых клеток в просвете не обнаружено, пустоты и расслоения сперматогенного эпителия не наблюдаются.

При изучении среза семенника экспериментальной группы С-25 мкг/кг было произведено измерение средней площади извитых семенных канальцев, поскольку, по утверждениям ряда авторов, данный показатель представляет собой достоверный критерий, отражающий структурно-функциональное состояние семенников и активность сперматогенеза (Саяпина И.Ю. 2013; Creasy D.M. 2001).

На основании полученных данных установлено уменьшение значений данного параметра у потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг ( $1515,61 \pm 280,17$  в  $\mu\text{км}^2$ ) в сравнении с потомством интактных мышей ( $1\ 696,20 \pm 562,39$   $\mu\text{км}^2$ ), что указывает на снижение продукции половых клеток в просвете канальца, в том числе угнетение сперматогенеза.

Для оценки генеративной функции потомства лабораторных мышей использовали определение средней площади ядер клеток Лейдига. Критерием послужило их общее эндокринное и паракринное действие на регуляцию интенсивности процессов сперматогенеза (Демяшкин Г.А. и др., 2009). В ходе наших исследований было выявлено уменьшение данного значения ( $5,8 \pm 1,43$   $\mu\text{км}^2$ ) у потомства экспериментальных мышей в сравнении с таковыми у потомства интактных особей ( $6,72 \pm 1,78$   $\mu\text{км}^2$ ).

Таким образом, при гистологической оценке среза семенника, окрашенного гематоксилином и эозином, потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг различаются видимые морфофункциональные изменения в структуре яичка: наблюдается видимое эстроген-опосредованное расширение кровеносных сосудов в интерстиции яичника, значения средней толщины сперматогенного эпителия в сравнении с этими же параметрами у потомства интактных особей больше, а значения среднего диаметра извитых канальцев в противовес меньше (таблица 1).

При сравнительном анализе семенников потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг с семенниками потомства интактной группы различимы патоморфологические изменения в структуре паренхимы: наблюдается запустевание некоторых извитых семенных канальцев с уменьшением значений средней площади, средний диаметр канальцев существенно не меняется, увеличивается средняя толщина сперматогенного эпителия, а также полость интерстиция, средняя площадь ядер клеток Лейдига в противовес уменьшается ( $4,93 \pm 1,31$   $\mu\text{км}^2$ ), миоидный слой не определяется, слой фибробластоподобных клеток разрушен, все стадии сперматогенеза со структурными нарушениями и активность процесса снижена. Имеются признаки очагового клеточного некроза эпителия семенных канальцев.

Таким образом, полученные нами данные при изучении влияния пренатального однократного внутримышечного введения синэстрола на потомство лабораторных мышей углубляют и расширяют уже существующие представления о повреждающем действии данного синтетического препарата синэстрола дозе С-40 мкг/кг.

#### **4.ОЦЕНКА МОРФОЛОГИИ СЕМЕННИКОВ ПОТОМСТВА БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОМ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ СИНЭСТРОЛА**

Морфометрических анализ показателей извитых семенных канальцев потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синтетического препарата синэстрол показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг количество извитых семенных канальцев в одном поле зрения значимые различия не обнаружены по сравнению с интактной группой. В показателе площади поперечного сечения извитого семенного канальца незначительное уменьшение произошло только в группе С-25 мкг/кг по сравнению с интактной группой. Показатель диаметра извитых семенных канальцев в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг незначительно уменьшился, но значимых различий не показал по сравнению с интактной группой. Показатель толщины сперматогенного эпителия незначительно увеличился в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг, но значимых различий не продемонстрировал по сравнению с группой интакта. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества клеток Сертоли в эпителии извитого семенного канальца на 11,3% ( $p \leq 0,05$ ) и 16,3% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Значимое уменьшение количества сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца произошло в экспериментальной группе С-40 мкг/кг на 7,6% ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с интактной группой. Показатель количества

сперматоцитов и сперматид в извитых семенных канальцах достоверно уменьшился в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг, по сравнению с группой интактных животных. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца на 10,9% ( $p \leq 0,05$ ) и 9,5% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно. Уменьшение площади ядер клеток Лейдига наблюдалось в обеих экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг, по сравнению с группой интактных животных, на 12,5% и 26,6% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Данные литературных источников свидетельствуют о том, что эстрогены, синтезируемые семенниками, участвуют в физиологическом развитии репродуктивной системы млекопитающих. Экзогенный же эстроген провоцирует аномалии развития половых органов (Hess R.A. 2018).

Генеративная функция семенников потомства лабораторных мышей оценивалась по усредненным параметрам площади поперечного сечения и диаметра больших и малых извитых семенных канальцев, толщины сперматогенного эпителия, площади ядер клеток Лейдига.

При гистологической оценке среза семенников интактной группы мышей, окрашенного гематоксилином и эозином, морфофункциональных изменений не выявлено: яичко типичного дольчатого строения, состоит из многочисленных извитых семенных канальцев, средний диаметр которых равен  $22,38 \pm 4,36$  мкм. Пространство между канальцами заполняет интерстиций, представленный прослойками рыхлой волокнистой соединительной ткани, сосудами и клетками Лейдига. Средняя площадь ядер клеток Лейдига соответствует значениям  $6,72 \pm 1,78$  мкм<sup>2</sup>, а средняя площадь извитых семенных канальцев составляет  $1696,20 \pm 562,39$  мкм<sup>2</sup>.

Стенки канальцев выстланы с внутренней стороны сперматогенным эпителием, с внешней — собственной оболочкой. Сперматогенный эпителий расположен на базальной мембране и включает два типа клеток: клетки Сертоли и сперматогенные клетки на разных стадиях созревания (сперматогонии,

сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды). Собственная оболочка представлена сетью коллагеновых волокон, образующих базальный слой, и одним слоем миоидных клеток, составляющих миоидный слой (Кузнецов С.Л. и др., 2016) средняя толщина которого равна  $4,41 \pm 0,86$  мкм.

При морфологической оценке среза семенника, окрашенного гематоксилином и эозином, интактной группы потомства белых беспородных лабораторных мышей изменений в структуре яичка не выявлено: сперматогенез в извитых семенных канальцах активный, половые клетки без количественных изменений, явлений слущивания незрелых половых клеток в просвете не обнаружено, пустоты и расслоения сперматогенного эпителия не наблюдаются.

При изучении среза семенника экспериментальной группы С-25 мкг/кг было произведено изменение средней площади извитых семенных канальцев, поскольку по утверждениям ряда авторов данный показатель представляет собой достоверный критерий, отражающий структурно-функциональное состояние семенников и активность сперматогенеза (**Ошибка! Источник ссылки не найден.** На основании полученных данных установлено уменьшение значений данного параметра у потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг ( $1515,61 \pm 280,17$  мкм<sup>2</sup>) в сравнении с потомством интактных мышей ( $1696,20 \pm 562,39$  мкм<sup>2</sup>), что указывает на снижение продукции половых клеток в просвете канальца, в том числе угнетение сперматогенеза (Creasy D.M. 2001).

Для оценки генеративной функции потомства лабораторных мышей использовали определение средней площади ядер клеток Лейдига. Критерием послужило их общее эндокринное и паракринное действие на регуляцию интенсивности процессов сперматогенеза (Демяшкин Г.А. 2009). В ходе наших исследований было выявлено уменьшение данного значения ( $5,8 \pm 1,43$  мкм<sup>2</sup>) у потомства экспериментальных мышей в сравнении с таковыми у потомства интактных особей ( $6,72 \pm 1,78$  мкм<sup>2</sup>).

Морфологическая оценка среза семенника, окрашенного гематоксилином и эозином, потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг показала видимые изменения в структуре яичка: наблюдается эстроген-опосредованное расширение

кровеносных сосудов в интерстиции яичка. Значения средней толщины сперматогенного эпителия в сравнении с этими же параметрами у потомства интактных особей больше, а значения среднего диаметра извитых канальцев в противовес меньше.

Одним из распространенных методов лечения олигоспермии является применение антиэстрогенов, так как они встраиваются в отрицательную обратную связь половых стероидов на уровне гипоталамуса и гипофиза, повышая эндогенную секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона гипоталамусом и, соответственно, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов гипофизом (Chehab M. et al., 2015). В свою очередь, ФСГ и ЛГ стимулируют клетки Лейдига в яичках, что ведет к повышению местной продукции тестостерона; таким образом, происходит стимуляция сперматогенеза с возможным улучшением фертильности.

Широкое распространение терапия антиэстрогенами за рубежом получила в начале двухтысячных годов. Так, S.S. Patankar и соавт. (2007) исследовали влияние кломифена цитрата на концентрацию сперматозоидов у мужчин в бесплодных парах с выраженной и умеренной олигозооспермией. Исследователи получили статистически значимые данные в обеих группах пациентов и сделали вывод, что эффекты кломифена цитрата проявляются в улучшении количества сперматозоидов, подвижности сперматозоидов и в определенной степени их морфологии (Patanekar S.S. et al., 2007).

При сравнительном анализе семенников потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг с семенниками потомства интактной группы различимы патоморфологические изменения в структуре паренхимы: наблюдается запустевание некоторых извитых семенных канальцев с уменьшением значений средней площади, средний диаметр канальцев существенно не меняется, увеличивается средняя толщина сперматогенного эпителия, а также полость интерстиции, средняя площадь ядер клеток Лейдига в противовес уменьшается ( $4,93 \pm 1,31$  мкм<sup>2</sup>), миоидный слой не определяется, слой фибробластоподобных клеток разрушен, все стадии сперматогенеза со структурными нарушениями, а

активность процесса снижена. Имеются признаки очагового некроза эпителия семенных канальцев.

Полученные нами данные при изучении влияния пренатального введения синэстрола в дозе С-40 мкг/кг на потомство белых беспородных лабораторных мышей углубляют и расширяют уже существующие представления о повреждающем пренатальном действии эстрогенов на структурные изменения в клетках семенниках потомства.

Изменения размеров извитых семенных канальцев являются важными количественными показателями, указывающими на угнетение сперматогенеза. Увеличение размеров извитых семенных канальцев является распространенным изменением со стороны мужской репродуктивной системы при различных интоксикациях (Шубина О.С. 2007). особенно ярко развивающееся при гиперандрогинемии, а также асептических воспалениях (Шепитько В.И. 2007). При этом авторы указывают на альтернативный характер подобных изменений и отмечают тенденцию к существенному уменьшению размеров канальцев по сравнению с нормой в дальнейшем. Аналогичные изменения мы наблюдаем у подопытных животных, когда увеличение диаметра и площади семенных извитых канальцев на начальных этапах онтогенеза сменяются их уменьшением по сравнению с интактными самцами в период половозрелости. Уменьшение площади канальцев при действии различных экстремальных факторов на организм отмечается многими авторами, в частности при эмоционально-болевым стрессе при гипокинетическом стрессе (Tash J.S. 1994), холодовом стрессе, нарушении гемодинамики в семеннике и т. д. Подобные изменения обычно связывают с уменьшением числа сперматогенных клеток в просвете канальца, однако увеличение диаметра канальцев при патологии, как правило, также сопровождается истончением сперматогенного пласта и уменьшением количества клеток в его составе.

## 5. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕМЕННИКОВ ПОТОМСТВА БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОМ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ СИНЭСТРОЛА

Для определения особенностей и наличия патологий извитого семенного канальца в исследовании рассматривали следующие молекулярно-биологические маркеры: индекс пролиферации Ki-67 — позитивные клетки (таблица 3), инактивацию функции белка p53, кодируемого геном-супрессором p53-позитивные клетки (таблица 4), и антиапоптотический индекс - Bcl-2-позитивные клетки (таблица 2).

Таблица 2

Количество Bcl-2 иммунопозитивных клеток в структурах семенников потомства при пренатальном введении синэстрола

| Показатели   | Интактная | С-25 мкг/кг | С-40 мкг/кг |
|--|-----------|-------------|-------------|
| Клетки сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца             | 25,4±1,8  | 27,6±1,7    | 27,8±1,5    |
| Клетки сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца              | 29,2±1,3  | 29,6±2,1    | 29,4±1,1    |
| Клетки сперматид в эпителии извитого семенного канальца                  | 24,8±0,8  | 25,8±0,8    | 26,0±1,1    |
| Клетки сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца             | 119,4±0,5 | 117,8±0,9   | 116,9±1,9   |
| Клетки в соединительнотканной строме между извитыми семенными канальцами | 5,0±0,7   | 2,2±0,8*    | 2,0±0,7*    |

Примечание: \* — в сравнении с интактной группой выявлены различия при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

Иммуногистохимический анализ маркера Bcl-2 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг показал, что количество клеток позитивно окрашенных сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца увеличилось на 8,6 и 9,4% по сравнению с интактной группой. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг в клетках сперматоцитов в эпителии извитого

семенного канальца различий не выявил. Количество позитивно окрашенных клеток сперматидов в эпителии извитого семенного канальца экспериментальных групп незначительно увеличилось по сравнению с интактной группой. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг по количеству сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца различий не показал. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами на 56,0% ( $p \leq 0,05$ ) и 60,0% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Таблица 3

Количество Ki-67 иммунопозитивных клеток в структурах семенников потомства при пренатальном введении синэстрола

| Показатели   | Интактная | С-25 мкг/кг | С-40 мкг/кг |
|--|-----------|-------------|-------------|
| Клетки сперматогониев в эпителии   | 27,6±1,7  | 25,4±1,8    | 29,4±1,1    |
| Клетки сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца                      | 29,2±1,3  | 29,6±2,1    | 27,8±1,5    |
| Клетки сперматид в эпителии извитого семенного канальца                          | 24,8±0,8  | 27,6±1,1*   | 25,8±0,8    |
| Клетки сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца                     | 121,7±0,3 | 120,9±0,1   | 119,3±0,4   |
| Клетки Лейдига в соединительнотканной строме между извитыми семенными канальцами | 5,0±1,0   | 2,6±0,5*    | 2,4±0,5*    |

Примечание: \* — в сравнении с интактной группой выявлены различия при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

В результате морфометрического анализа ИГХ-маркера Ki-67 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг позитивно окрашенных клеток в сперматогониях по сравнению с интактной группой значимых различий не выявлено. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг в клетках

сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца различий не показал. Количество позитивно окрашенных клеток сперматидов в эпителии извитого семенного канальца в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг увеличилось по сравнению с интактной группой на 11,3% ( $p \leq 0,05$ ) и 4,1%, соответственно. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 и С-40 мкг/кг по количеству сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца различий не показал. Сравнительный анализ с интактной группой продемонстрировал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества клеток Лейдига в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами на 52,0% ( $p \leq 0,05$ ) и 48,0% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Таблица 4

Количество р53 иммунопозитивных клеток в структурах семенников потомства при пренатальном введении синэстрола

| Показатели   | Интактная | С-25 мкг/кг | С-40 мкг/кг |
|--|-----------|-------------|-------------|
| Клетки сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца                     | 24,4±1,4  | 25,5±1,0    | 26,2±0,8    |
| Клетки сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца                      | 27,8±0,8  | 26,8±0,9    | 27,0±0,7    |
| Клетки сперматид в эпителии извитого семенного канальца                          | 25,0±1,0  | 26,3±0,9    | 25,8±0,8    |
| Клетки сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца                     | 118,9±1,2 | 121,6±0,2   | 120,7±0,5   |
| Клетки Лейдига в соединительнотканной строме между извитыми семенными канальцами | 5,4±1,1   | 3,3±0,5*    | 4,0±0,7*    |

Примечание: \* — в сравнении с интактной группой выявлены различия при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

Морфометрический анализ ИГХ-маркера р53 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг позитивно окрашенных клеток в сперматогониях по сравнению с интактной группой показал незначительное

увеличение. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг в клетках сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца различий не показал. Сравнительный анализ позитивно окрашенных клеток сперматидов в эпителии извитого семенного канальца в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг значимых различий не показал по сравнению с интактной группой. Анализ сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца в интактной группе по сравнению с экспериментальными группами С-25 и С-40 мкг/кг различий не показал. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества клеток в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами на 61,1% ( $p \leq 0,05$ ) и 74,1% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

## 6.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате морфометрического анализа ИГХ-маркера Ki-67 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг позитивно окрашенных клеток в сперматогониях, сперматоцитах и в сперматозоидах по сравнению с интактной группой различий не показало. Наблюдались изменения в сторону увеличения позитивно окрашенных клеток в сперматидах на 11,3% ( $p \leq 0,05$ ) и 4,1%, соответственно по сравнению с интактной группой. А также отмечалось значимое уменьшение количества позитивно окрашенных клеток Лейдига на 52,0% ( $p \leq 0,05$ ) и 48,0% ( $p \leq 0,05$ ) соответственно по сравнению с интактной группой.

Экспрессия маркера Vcl-2 при воздействии синтетического препарата синэстрола в дозах 25 и 40 мкг/кг показала, что количество позитивно окрашенных клеток в сперматогониях, увеличилось на 8,6 и 9,4%, соответственно, по сравнению с интактной группой. При сравнительном анализе интактной группы с экспериментальными группами С-25 и С-40 экспрессия маркера Vcl-2 в клетках сперматоцитов и сперматозоидах различий не показала, наблюдалось незначительное увеличение позитивно-окрашенных клеток в

сперматиды. Показатель экспрессии маркера Vcl-2 в экспериментальных группах С-25 и С-40 уменьшился в клетках Лейдига на 56,0% ( $p \leq 0,05$ ) и 60,0% ( $p \leq 0,05$ ), соответственно. Пренатальное введение синтетического аналога эстрогена синэстрола в условиях эксперимента оказывает негативное влияние на морфофункциональное состояние семенников потомства. На ряду с этим, наблюдались нарушения эндокринного аппарата семенников в виде снижения численности клеток Лейдига и их функциональной активности, о чем свидетельствует и ИГХ маркер p53.

Полученные результаты у потомства белых беспородных лабораторных мышей дают возможность использовать экспериментальное исследование для поиска средств коррекции тестикулярной дисфункции.

## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. // М.: Медицина - 1990. – С. 384. ISBN 5-225-00753-8
2. Арзамасцев, Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. – Под ред. Хабриева Р.У.– М.: Медицина, 2005. – С. 41–54.
3. Артифексов, С.Б. Состояние органного кровотока в семенниках и придатках самцов крыс в условиях экспериментального венозного тестикулярного кровотока / С.Б. Артифексов, А.А. Артюхин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2007. — Т. 143, № 6. — С. 623–627.
4. Багацька, Н.В. Генетичні фактори у виникненні порушень статевого розвитку у хлопців-підлітків : автореф. дис. ... на здобуття наук, ступеня д-ра біол. наук : 03.00.15 / Багацька Наталія Василівна. — Киев, 2004. — 38 с.,
5. Боровая, Т.Г. Фолликулогенез и факторы его модуляции : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.00.23 / Боровая Татьяна Геннадьевна. — Москва, 1993. — 50 с.
6. Внутритрубочное развитие человека: руководство для врачей / под ред. А.П. Милованова, С.В. Савельева. — Москва: МВД, 2006. — 384 с.
7. Гуськова, Т.А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований// Токсикологический вестник. – 2010.- № 5 (104). – С. 2-6.
8. Даренская, А.Д., Доброва Н.В., Степанова Е.В. Молекулярно-биологический маркер Vcl-2 при колоректальном раке: характеристика, роль в механизмах регуляции апоптоза, влияние на прогноз (обзор литературы). Современная Онкология. 2019. № 21 (1). С. 52–58. DOI: 10.26442/18151434.2019.1.190278
9. Демяшкин, Г.А. Паракринные механизмы регуляции функций семенника (иммуноцитохимический аспект) / Г.А. Демяшкин, Н.Ш. Амиров // Фундаментальные исследования. — 2009. — № 2. — С. 88–90.

10. Иммуногистохимические методы: Руководство // Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО / Пер. с англ. под ред. Франка Г.А. и Малькова П.Г. М. 2011. 224 с.
11. Киселев, Ф. Л. О молекулярных механизмах возникновения опухолей / Ф. Л. Киселев // Природа. – 2014. – № 4(1184). – С. 12-21.
12. Кузнецов, С.Л. Гистология, цитология и эмбриология : краткий курс / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров. — Москва : МИА, 2016. — 532 с.
13. Кузнецова, Т.Е. Морфофункциональные изменения в некоторых эндокринных органах крысят при действии ацетата свинца / Т.Е. Кузнецова, О.А. Манеева, Е.Л. Рыжковская // Здоровье и окружающая среда : сборник научных трудов. — Минск, 2006. — Вып. 8. — С. 590–595.
14. Курс гистологии / Н.В. Бойчук, Р.Р. Исламов, Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Чельшев. — Казань : Поволжский книжный центр, 1995. — 282 с.
15. Курило, Л. Ф. Система тестирования факторов, повреждающих женские и мужские гаметы и гонады / Л. Ф. Курило // Гигиена и санитария. – 2011. – № 5. – С. 72-78.
16. Малишкіш, І.Н. Дисперсний аналіз інтеграції судинно та гермшативної систем яєчка у патогенезі негایدнос™ / І.Н. Малишкіш // Лжарська справа. — 2000. — № 3. — С. 77–80.
17. Мамина, В.П. Влияние ионизирующего излучения и ксенобиотиков на сперматогенный эпителий лабораторных животных / В.П. Мамина, Л.Д. Шейко // Гигиена и санитария. — 2001. — № 6. — С. 24–27.
18. Нарбутова, Т.Е. Морфологическое обоснование использования эрбисола для коррекции негативного влияния свинца на репродуктивную систему у мышей в эксперименте / Т.Е. Нарбутова // Актуальні проблеми сучасної медицини. — 2011. — Т. 11, № 3. — С. 66–69.
19. Никитин, А. И. Влияние вредных факторов среды на репродуктивную, эндокринную системы и эпигеном / А. И. Никитин, О. В. Сергеев, А. Н. Суворов. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Акварель", 2016. – 348 с.

20. Потапов, С.Н. Морфологические особенности клеток Лейдига плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией / С.Н. Потапов, Н.И. Горголь, А.В. Андреев // Медицина сегодня и завтра. — 2011. — Т. 4, № 53. — С. 23–26.
21. Резников А. Г., Пишак В. П., Носенко Н. Д. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология / А.Г. Резников, В.П. Пишак, Н.Д. Носенко [и др.]; (под общ. ред. чл.-корр. НАН и АМН Украины А.Г. Резникова). - Черновцы : Медакадемія, 2004. - 318 с. : ил., портр. ; 24 см
22. Рузен-Ранге, Э. Сперматогенез у животных / Э. Рузен-Ранге ; пер. с англ. Л.В. Даниловой. — Москва : Мир, 1980. — 259 с.
23. Самусев, Р.П. Железы внутренней секреции / Р.П. Самусев, Е.В. Зубарева. — Москва : Мир и образование, 2011. — 144 с.
24. Саяпина, И.Ю. Морфофункциональная характеристика органов репродуктивной системы самцов крыс при адаптации к низким температурам и на фоне коррекции: экспериментальное исследование : дис. ... д-ра биол. наук : 06.02.01 / Саяпина Ирина Юрьевна. — Благовещенск, 2013. — 386 с.
25. Семченко, В. В. Гистологическая техника. / В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. И. Ноздрин, В. Н. Артемьев. – Омск: Омская областная типография, 2006. – 290 с.
26. Сизоненко, М.Л. Роль хронических экспериментальных поражений гепатобилиарной системы матери различного генеза в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы потомства : дис. ... док. мед. наук : 03.03.04 / Сизоненко Максим Леонидович. — Челябинск, 2015. — 313 с.
27. Синдром андрогенной недостаточности как маркер техногенного загрязнения среды обитания / Ф.Х. Камилов, Ш.Н. Галимов, Э.Ф. Акметдинов [и др.] // Проблемы репродукции. — 2002. — Т. 8, № 1. — С. 46–50.
28. Степанова Е.В., Барышников А.Ю. Никогосян С.О., Кузнецов В.В., Карапетян В.Л. Молекулярно-биологические факторы прогноза рака яичников начальных стадий. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2011; 22(1): 37-41

29. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, М. Н. Карпенко [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского. — 2-е изд., испр. и доп. — Санкт-Петербург: СпецЛит, 2014. — 119 с. — ISBN 978-5-299-00596-7

30. Тишевская Н. В., Максаков Д. А., Головнева Е. С. Морфологические особенности сульпиридной модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы у крыс // Экспериментальная и клиническая урология. — 2017. — № 2. — С. 16-19

31. Ткачев А.В., Ткачева О.Л., Коровин Ю.И., Вертипрахов В.Г. Молекулярно-генетические методики в практической физиологии, ветеринарии и животноводстве. Монография. Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. 317 с. ISBN 978-5-9675-1873-7.

32. Ткачев А.В., Евсюкова А.А., Фрундина А.Д. Эффективность модификации технологии криоконсервирования спермы жеребцов для замораживания эякулятов хряков // Инновационные решения в аграрной науке – взгляд в будущее: Материалы XXIII международной научно-производственной конференции, Майский, 28–29 мая 2019 года. Том 2. Майский: Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина, 2019. С. 61-62.

33. Фролов М.А., Слепова О.С., Ловпаче Дж.Н., Морозова Н.С. Маркёры апоптоза и методы изучения апоптотической гибели клеток. Сборник научных статей XI Международного конгресса "Глаукома: теории, тенденции, технологии". Москва. 2013 С. 265-270.

34. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 49-51.

35. Шепитько, В.И. Динамика ранних сроков острого асептического воспаления семенников под влиянием трансплантации криоконсервированной плаценты / В.И. Шепитько, Е.В. Стецук // Морфология — 2007. — Т. 1, № 1. — С. 120–123.

36. Шубина, О.С. Свинец и его влияние на организм / О.С. Шубина, Л.В. Грызлова, Ю.В. Киреева. — Саранск : Мордов. гос. пед. ин-т, 2007. — 58 с.
37. Chehab, M. On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility / M. Chehab, A. Madala, J.C. Trussell // *Fertil. Steril.* — 2015. — Vol. 103, № 3. — P. 595–604.
38. Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears // *Toxicologic Pathology.* - 2015.- № 43(6).- С. 776-793
39. Creasy, D.M. Pathogenesis of male reproductive toxicity / D.M. Creasy // *Toxicologic Pathology.* — 2001. — Vol. 29, № 1. — P. 64–76.
40. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid residues in semen of Ontario farmers / T.E. Arbuckle, S.M. Scharader, D. Cole [et al.] // *Reprod. Toxicol.* — 1999. — Vol. 13, № 6. — P. 421–429.
41. Effect of clomiphene citrate on sperm density in male partners of infertile couples / S.S. Patankar, S.B. Kaore, M.V. Sawane [et al.] // *Indian J. Physiol. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 51, № 2. — P.195–198.
42. Histopathology of the testis quantitative evaluation of testis histopathology / L.D. Russell, R.A. Ettlin, A.P. Hikim, E.D. Clegg. — [S. l.] : [s. n.], 1990. — P. 240–264.
43. Huang X., Wu D.Y., Chen G., Manji H., Chen D.F. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism // *Eur. J. Ophthalmol.* 2001. Jul-Sep.11 Suppl 2. P.12-22.
44. Hess, R.A. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Molecular mechanisms in spermatogenesis / R.A. Hess, R.L. Franca // Austin. TX: Landes Bioscience. — [S. l.] : Springer Science, 2008. — P. 1–15.
45. Hess, R.A. Estrogen in the male: a historical perspective / R.A. Hess, P.S. Cooke // *Biol. Reprod.* — 2018. — Vol. 99, № 1. — P. 27–44.
46. Mooney S.M., Miller M.W. Expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in the brain of the developing rat // *Dev. Brain Res.* 2000. Vol. 123. P. 103-117

47. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities / В. Р. Копнин, Р. В. Копнин, Н. В. Хромова, Л. С. Агарова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2008. – Vol. 1. – No 1. – P. 2-9.

48. Sablina A.A., Chumakov P.M., Kopnin B.P. Tumor suppressor p53 and its homologue p73alpha affect cell migration. J Biol Chem. 2003; 278(30):27362–71. DOI: 10.1074/jbc.M300547200

49. Tash, J.S. Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases / J.S. Tash, G.E. Bracho // J. Androl. — 1994. — Vol. 15, № 6. — P. 505–509.

## **8.ПРИЛОЖЕНИЕ**

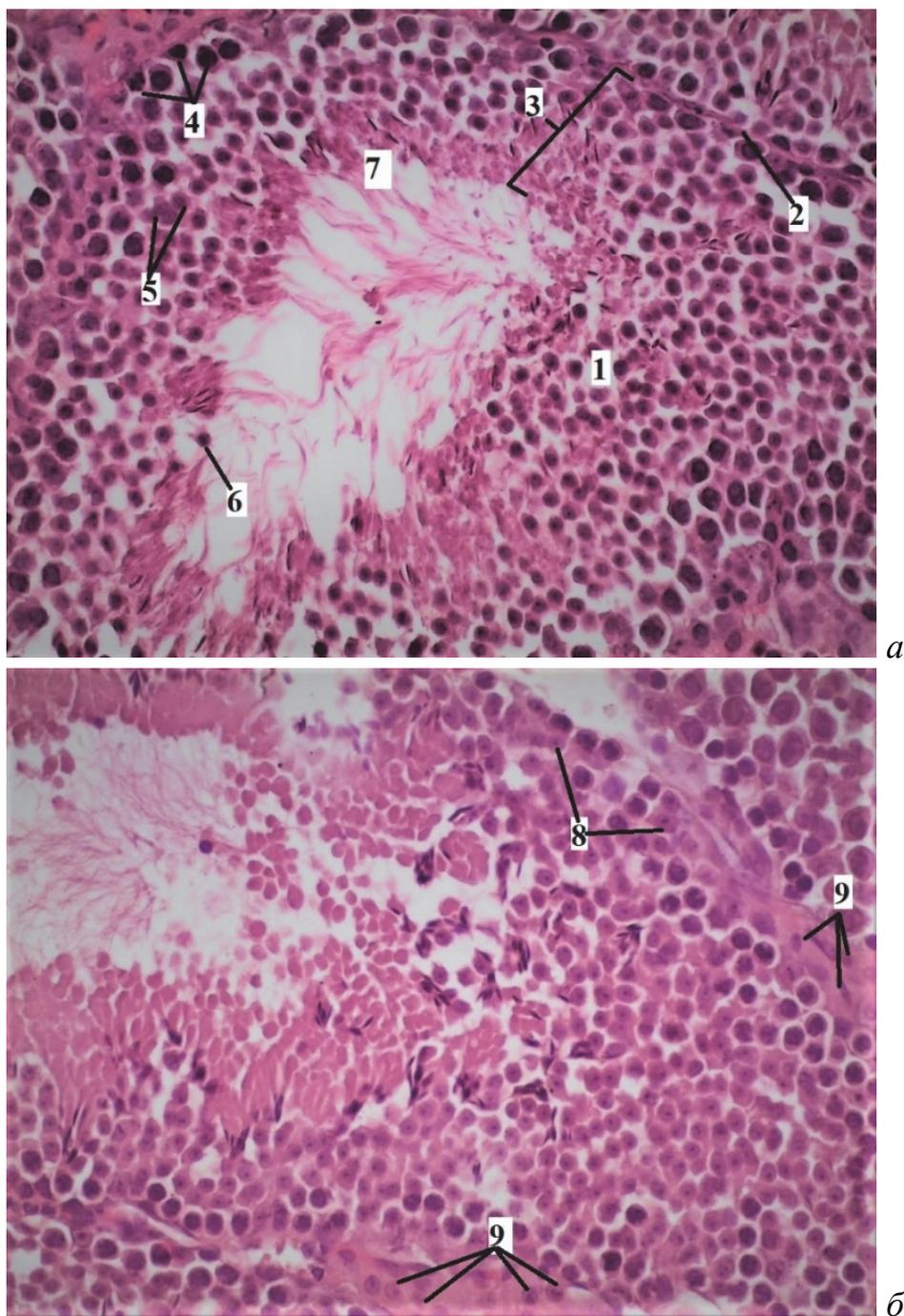
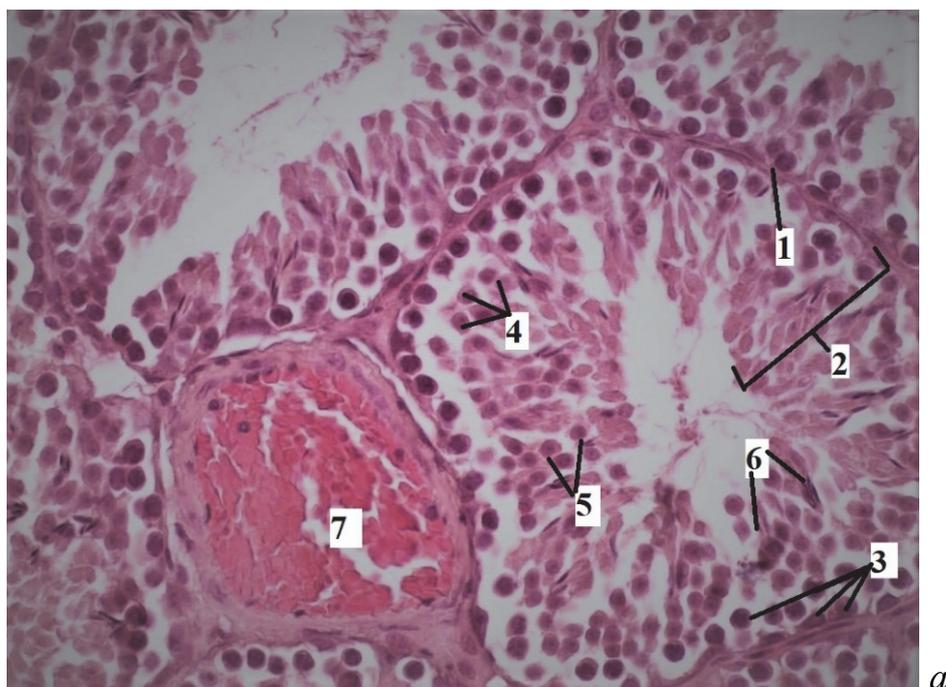
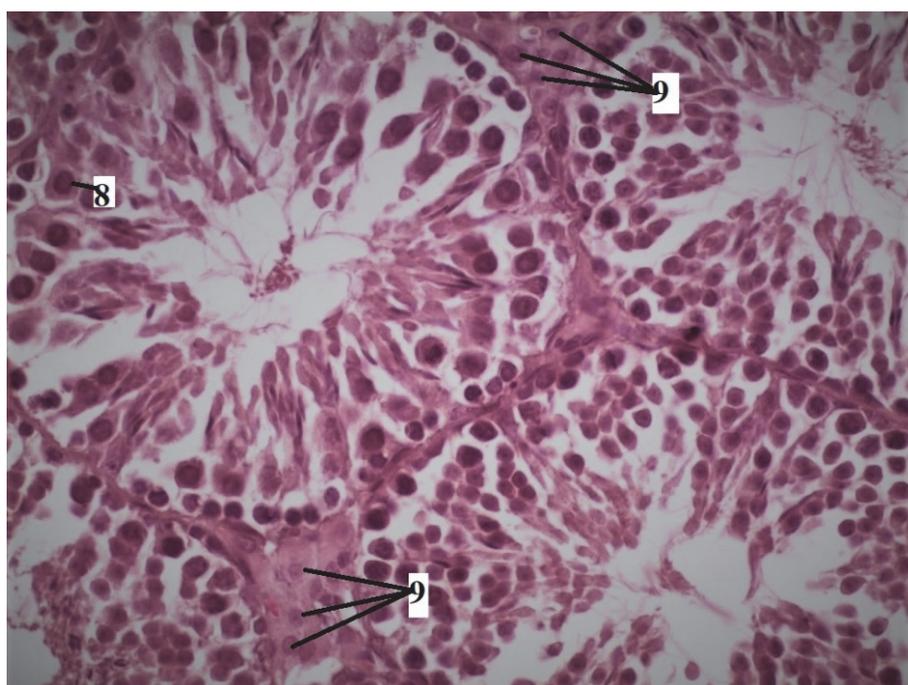


Рисунок 1. Семенник потомства интактной группы: 1 — извитой семенной каналец; 2 — базальная мембрана; 3 — сперматогенный эпителий; 4 — сперматогонии; 5 — сперматоциты; 6 — сперматиды; 7 — сперматозоиды; 8 — клетка Сертоли; 9 — клетки Лейдига. Окраска гематоксилином и эозином. х400



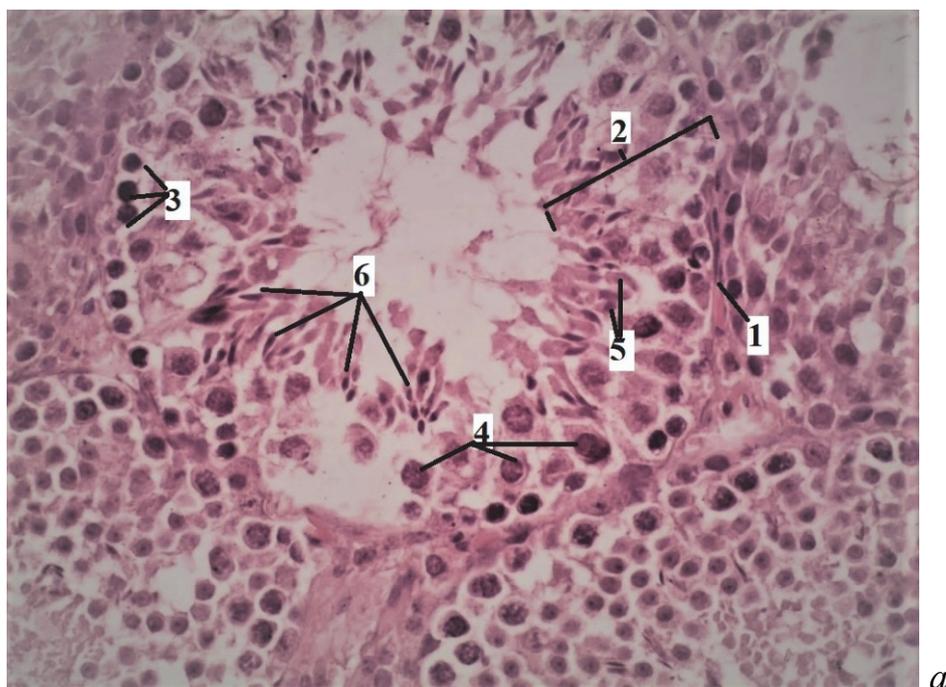
*a*



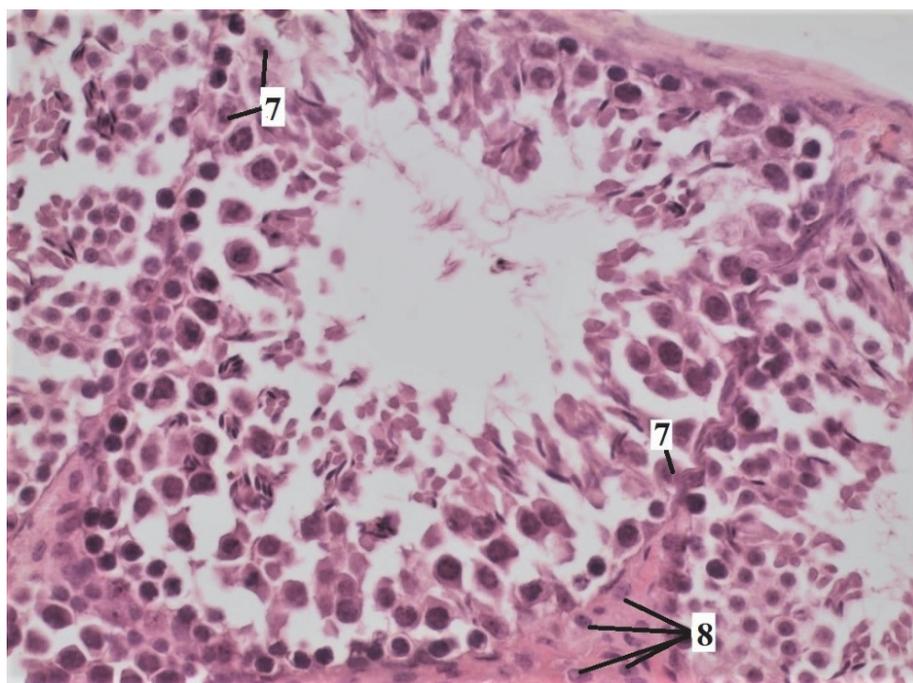
*б*

Рисунок 2. Семенник потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг:  
 1 — базальная мембрана; 2 — сперматогенный эпителий; 3 — сперматогонии;  
 4 — сперматоциты; 5 — сперматиды; 6 — сперматозоиды; 7 — кровеносные  
 сосуды; 8 — клетка Сертоли; 9 — клетки Лейдига.

Окраска гематоксилином и эозином. х400



*a*



*б*

Рисунок 3. Семенник потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг:  
 1 — базальная мембрана; 2 — сперматогенный эпителий; 3 — сперматогонии;  
 4 — сперматоциты; 5 — сперматиды; 6 — сперматозоиды; 7 — клетка Сертоли;  
 8 — клетки Лейдига. Окраска гематоксилином и эозином. x100

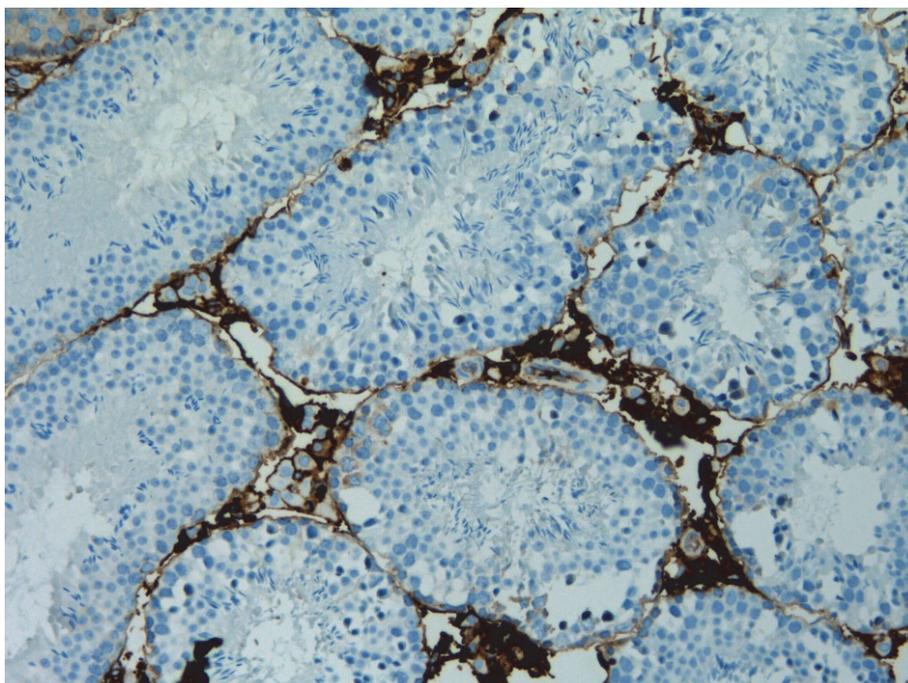


Рисунок 4. Семенник потомства интактной группы. ИГХ-реакция на маркер Vcl-2.  
Докраска ядер гематоксилином. x100

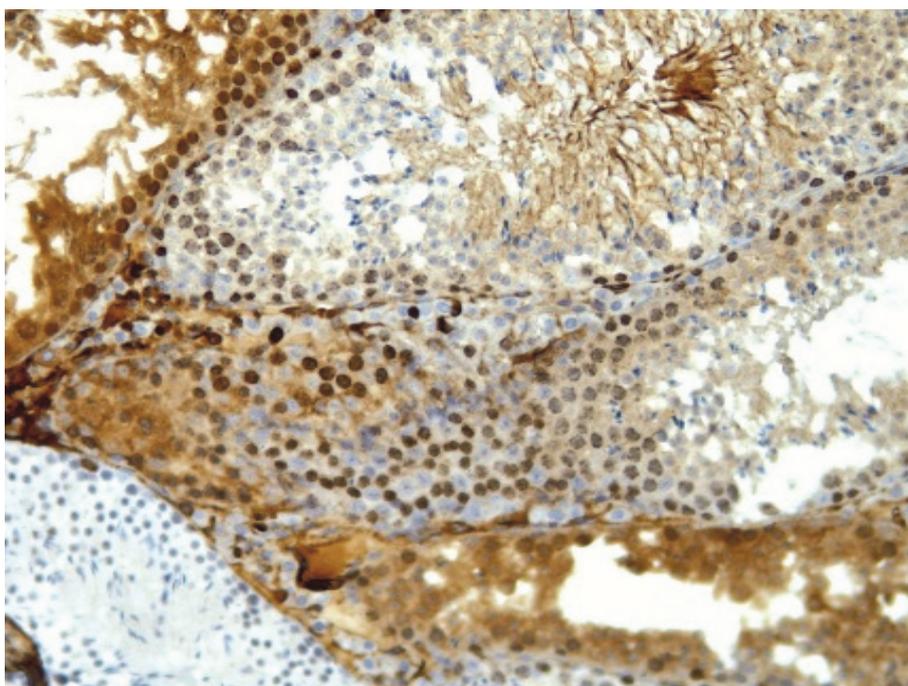


Рисунок 5. Семенник потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг.  
ИГХ-реакция на маркер Vcl-2. Докраска ядер гематоксилином. x100

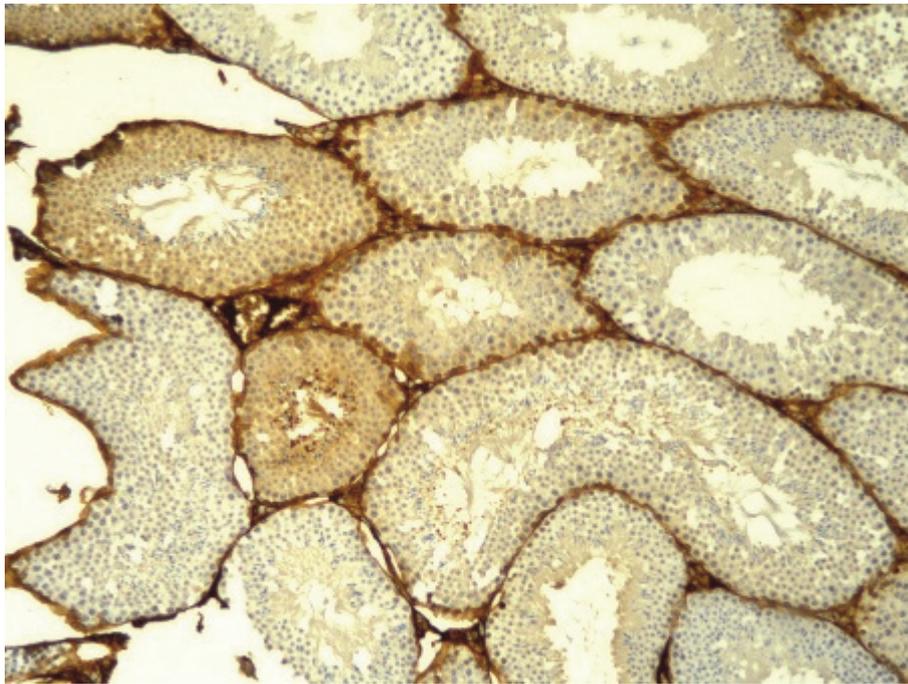


Рисунок 6. Семенник потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг. ИГХ-реакция на маркер Vcl-2. Докраска ядер гематоксилином. x100

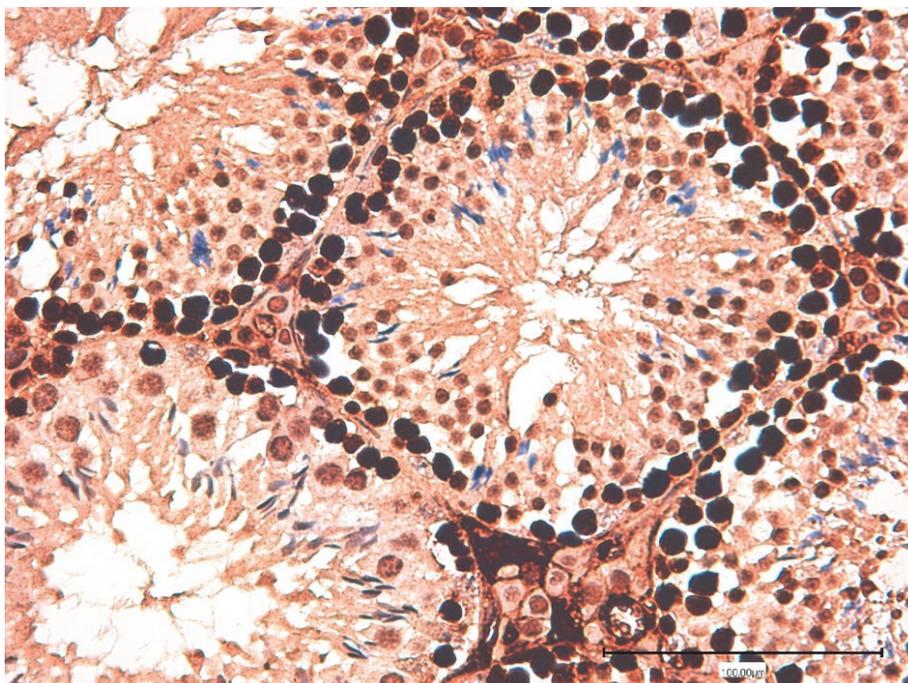


Рисунок 7. Семенник потомства интактной группы. ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. x100

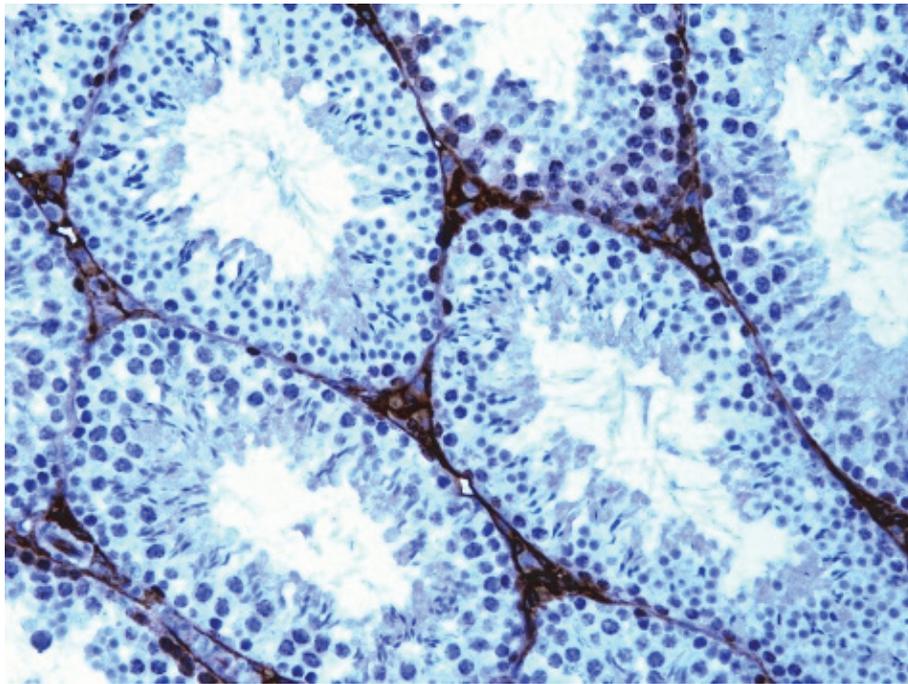


Рисунок 8. Семенник потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг.  
ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. x100

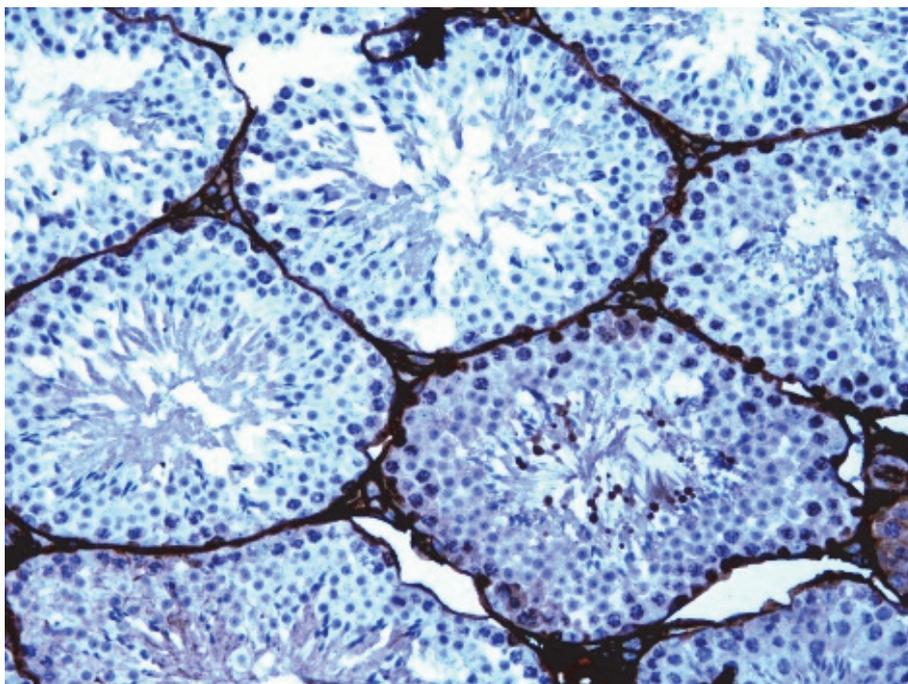


Рисунок 9. Семенник потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг.  
ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. x100

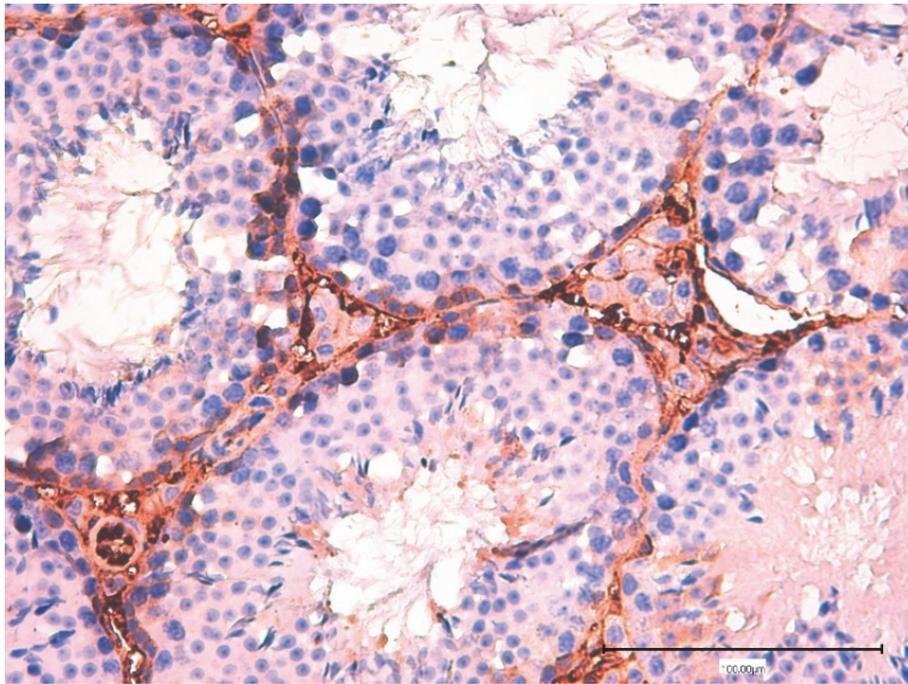


Рисунок 10. Семенник потомства интактной группы. ИГХ-реакция на маркер p53.

Докраска ядер гематоксилином. x100

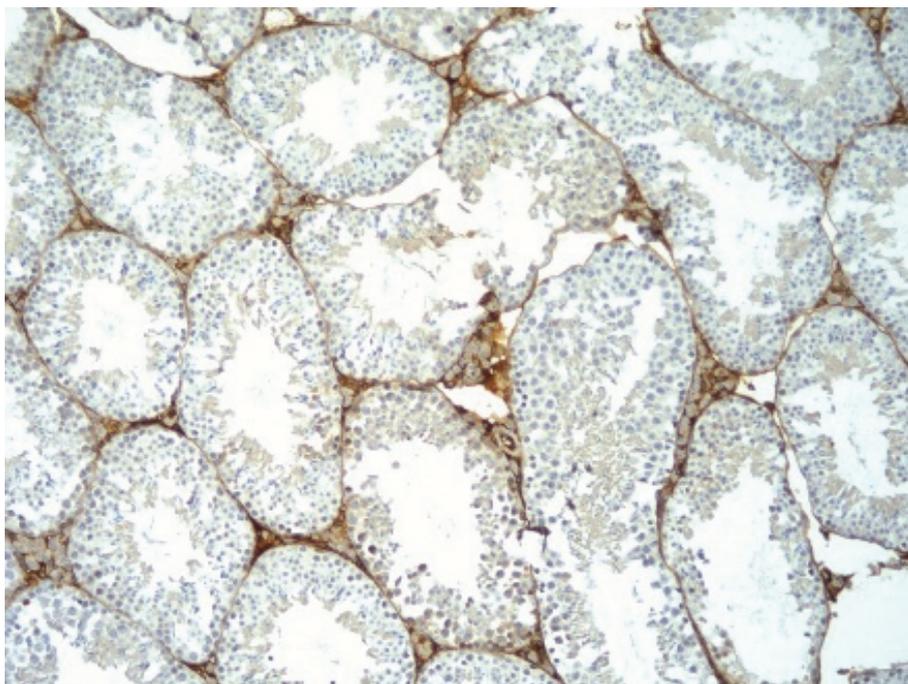


Рисунок 11. Семенник потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг.

ИГХ-реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. x100

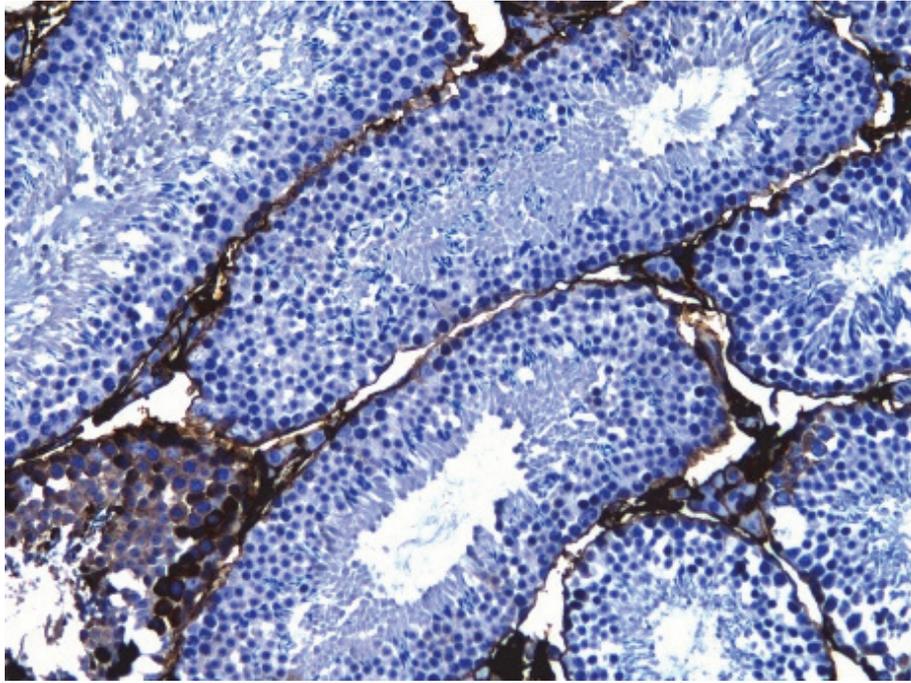


Рисунок 12. Препарат семенника потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг. ИГХ-реакция на маркер р53. Докраска ядер гематоксилином. х100

**Скрипкин В. С., Сулайманова Р. Т.,  
Квочко А. Н., Хайруллин Р. М.**

**МОРФОЛОГИЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЯ  
СЕМЕННИКОВ ЖИВОТНЫХ  
ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ  
В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

*Методические рекомендации*

*Публикуется в авторской редакции*

Подписано в печать 28.09.2023. Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Печать офсетная. Гарнитура «Times». Усл. печ. л. 2,33. Тираж 500 экз.  
Заказ № 416.

Издательство Ставропольского государственного аграрного университета «АГРУС»,  
355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12. Тел/факс: (8652) 35-06-94.  
E-mail: agrus2007@mail.ru

Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии  
издательско-полиграфического комплекса СтГАУ «АГРУС»,  
г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15.