



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47116 (13) U

(51) МПК (2009)

A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАДІЙ ЦИКЛУ СПЕРМАТОГЕННОГО ЕПІТЕЛІЮ

1

2

(21) u200911257

(22) 06.11.2009

(24) 11.01.2010

(46) 11.01.2010, Бюл.№ 1, 2010 р.

(72) ЗАПОРОЖАН ВАЛЕРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ХО-
ЛОДКОВА ОЛЕНА ЛЕОНІДІВНА, ЩЕРБАТЮК АЛІ-
НА ЛЕОНІДІВНА, ПИХТЄЄВ ДМИТРО МИХАЙЛО-
ВИЧ(73) ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб визначення стадій циклу сперматогенного епітелію шляхом гістологічного дослідження, який **відрізняється** тим, що тканину яєчка миші забарвлюють гематоксилін-еозином, після цього в сім'яному каналці ідентифікують відповідну стадію циклу сперматогенного епітелію методом виявлення кількості та сполучення шарів в сперматогенному епітелії.

Корисна модель відноситься до області медицини, а саме до експериментальної фізіології, і може бути використана для оцінки стану тестикулярної тканини за умов експерименту.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є розробка, в якій виконується розділення циклу сперматогенного епітелію (СЕ) на стадії за змінами в акросомній системі сперматид [1,2]. Суть даного способу полягає в тому, що на гістологічних зрізах проводять PAS-реакцію, а потім при збільшенні $\times 900$ під олійною іммерсією розрізняють етап формування акросомного ковпачка в сперматиді. Спочатку цей процес поділяють на чотири фази. Перша фаза - фаза Гольджи, що починається з появи декількох дрібних гранул в області комплексу Гольджи, які потім зливаються у дві, а потім в одну велику гранулу. Друга фаза - фаза ковпачка, в цей час акросомна гранула приходить в контакт з ядром клітини та створює структуру, що нагадує ковпачок. Під час третьої фази - акросомної, відбуваються складні перетворення в ядрі сперматиди та в акросомі, в результаті яких вони набувають форми, близької до тієї, що характерна для сперматозоїда. Четверта фаза - дозрівання - полягає в остаточному формуванні сперматозоїда. Кожна з цих фаз включає визначені стадії циклу СЕ, кількість яких варіює серед різних тварин. В циклі СЕ миші було виділено 12 стадій. Порядковий номер стадії визначають за ступенем формування акросомного ковпачка сперматид. Виділяють клітинний склад, притаманний кожній стадії. У всіх стадіях присутні сперматогонії типу - А, проміжний тип сперматогоній зустрічається в II -

III стадіях, а сперматогонії типу Б виявляються під час IV стадії циклу. Сперматоцити у стані прелептотени можна побачити на V - VI стадіях, у стані лептотени - на VII -IX стадіях, сперматоцити у стані зиготени присутні в X - XII стадіях, у стані пахитени - з I стадії нового циклу і майже до кінця циклу СЕ. Наприкінці циклу (XI - XII стадії) починається диплотенна фаза з діакінезом та метафазою першого розподілу дозрівання, після чого з'являються сперматоцити II порядку. Потім вони діляться, даючи початок сперматидам. В склад клітинних сполучень під час циклу з I по VI поряд із сперматидами входять також сперматозоїди, що формуються, або сперматиди на останніх етапах розвитку.

Але даний спосіб визначення стадійності циклу СЕ можливо застосовувати тільки після проведення гістохімічної реакції (PAS-реакції) шляхом забарвлення препаратів ШИК - гематоксиліном. Такий спосіб є допоміжним до обов'язкової методики забарвлення гематоксилін-еозином і потребує додаткових витратних матеріалів та часу. Ідентифікація стадій, що її описано в прототипі, відбуваються за складними критеріями, які можливо визначити тільки під великим збільшенням ($\times 900$). Недоліком досліджень стану СЕ за використанням запропонованих в прототипі стадій є те, що при даному зафарблюванні не можливо вивчити всі критерії, необхідні для комплексного описання тестикулярної тканини, і для повного дослідження структурних особливостей яєчок необхідно робити два препарати з одного яєчка, один з яких зафарблюється гематоксилін-еозином, а другий ШИК-

(13) U

(11) 47116

(19) UA

гематоксиліном. Відомо, що для будь-яких досліджень з метою зберігання максимальної достовірності отриманих результатів, обираються дві поллярні за морфологічними властивостями стадії. Отже, визначивши стадію сперматогенезу на препаратах, забарвлених ШИК-гематоксиліном, описову частину досліджень доводиться проводити на препаратах, забарвлених гематоксилін-еозином.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалення способу оцінки морфофункціонального стану тестикулярної тканини шляхом ідентифікації стадій циклу СЕ на гістологічних препаратах, що їх забарвлюють гематоксилін-еозином, а потім визначають стадійність, при відносно малому збільшенні ($\times 200$), що зручно для морфометричних досліджень, так як при цьому до одного полю зору потрапляє більша кількість сім'яних канальців. Це зменшує кількість полів зору, що необхідні для дослідження, без зниження статистичної вірогідності отриманих результатів.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно корисної моделі, тканину яєчка миші забарвлюють гематоксилін-еозином, після чого в сім'яному канальці ідентифікують відповідну стадію циклу сперматогенного епітелію методом виявлення кількості та сполучення шарів в сперматогенному епітелії.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Вилучають тестикули 60 мишей лінії ICR віком 6-7 місяців, які знаходились в стандартних умовах віварію, та поміщають їх у 10% розчин формаліну. Через добу поперечним розтинном вирізають середню частину органу та протягом наступної доби дофіксують в 10% розчині формаліну. Проводять спиртами зростаючої концентрації, роблять парафінові зрізи завтовшки 3-5мкм та зафарблюють гематоксилін-еозином. Структуру яєчок вивчають під світловим мікроскопом (збільшення $\times 100$; $\times 200$).

На поперечних зрізах канальців існує 3-5 популяцій клітин СЕ, що розташовані концентричними шарами, при цьому клітини більш ранніх популяцій знаходяться ближче до базальної мембрани сім'яного канальця. Розподілення статевих клітин різних стадій розвитку в складі СЕ не є випадковим, вони створюють сполучення строго постійного складу. Згідно до корисної моделі, весь пласт СЕ умовно підрозділяють на чотири шари, перший з яких представлений сперматогоніями (зона розподілення), другий шар -сперматоцитами I порядку (зона росту), третій шар - сперматоцитами II порядку та сперматидами (зона дозрівання) та четвертий шар - сперматозоїдами (зона формування). Сперматозоїди в окремих сім'яних канальцях та-

кож морфологічно відрізняються один від одного, і, в залежності від етапу формування, їх підрозділяють на три типи: тип а представлений клітинами круглої або овальної форми, більший діаметр яких знаходиться в радіальному напрямку, тип b - представлений клітинами із витягнутою цитоплазмою вздовж радіуса канальця, яка майже не створює обідка навколо базальної частини ядра. Ядра овальної форми, менші ніж ядра клітин типу а, більший діаметр яких направлений у бік сперматид. Для клітин типу с притаманні витягнуті в радіальному напрямку ядра, практично не обведені цитоплазмою, тільки з боку просвіту.

На одному зрізі канальця не завжди можливо виявити наявність всіх вказаних шарів та типів сперматозоїдів. Тому, знаючи послідовність процесу сперматогенезу та морфологічні характеристики клітин кожного шару СЕ, визначають їх сполучення, яке відповідає конкретній стадії циклу СЕ.

Розрізняють 7 стадій циклу СЕ для мишей, кожен з яких позначають формулою, де арабськими цифрами послідовно через кому відображають номери шарів, що присутні в даному канальці, і в тих канальцях, в яких присутній четвертий шар СЕ, поряд з номером помічають його тип - а, b чи c I стадії сперматогенезу відповідає формула 1, 2, 3; II стадії - 1 2 4a; III стадії - 1 2 4b; IV стадії - 1 2 4c; V стадії - 1 2 3 4c; VI стадії - 1 3 4c; VII стадії - 1 3. При вивченні різних факторів, що впливають на сперматогенез, найзручніше використовувати V та VII стадії, так як вони є протилежними за кількістю шарів СЕ, що в них присутні.

Таким чином, доведено, що запропонований спосіб розподілення циклу СЕ на стадії є більш практичним за прототип, тому що він є простим, економічним та дозволяє вивчати сім'яні канальці, зберігаючи комплексність підходу до вивчення морфологічного стану яєчок.

У порівнянні з прототипом, запропоноване технічне рішення дозволяє також за рахунок визначення стадійності на зрізах яєчок, зафарбленні гематоксилін-еозином та на порівняно малому збільшенні досягти значного прогресу у вивченні стану яєчок, а саме, проводити як морфометричні, так і описові дослідження на одному препараті.

Література:

1. Leblond C.P. Spermiogenesis in rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique / C. P. Leblond, Y. Clermont // American journal of anatomy. - 1952. - V.90 - P.167-215.
2. Leblond C.P. Definition of the stages of the cycle the seminiferous epithelium in rat / C.P. Leblond, Y. Clermont // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1952. - V.55-P.548-573.