

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



(19) ВУ (11) 1951

(13) С1

(51)⁶ G 01N 33/483,
G 01N 23/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПАТЕНТНЫЙ
КОМИТЕТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

(54)

СПОСОБ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

(21) Номер заявки: 950747

(22) 26.06.1995

(46) 30.12.1997

(71) Заявитель: Гродненский государственный медицинский институт (ВУ)

(72) Авторы: Абакумов В.З., Слободская Н.С., Троян Э.И. (ВУ)

(73) Патентообладатель: Гродненский государственный медицинский институт (ВУ)

(57)

Способ сравнительной оценки активности сперматогенеза, включающий введение ³Н-тимидина, отличающийся тем, что ³Н-тимидин вводят животным опытной и контрольной групп внутрибрюшинно в дозе 0,5-1,0 млКи/г, причем дозу предварительно разделяют на три равные порции, которые вводят с интервалом 8-9 часов, на 48 сутки животных забивают, придатки помещают в жидкостный сцинтилляционный β-счетчик и, сравнивая среднее число импульсов в единицу времени на единицу массы ткани, судят об активности сперматогенеза.

(56)

1. Патент Великобритании 1519268, МКИ G01N 33/16, 1978.

Изобретение относится к области экспериментальной медицины и биологии и может быть использовано в эксперименте для определения активности сперматогенеза.

Существуют различные способы изучения процесса сперматогенеза. Широко используется подсчет количества сперматогоний на серийных гистологических срезах семенных канальцев тестикул. Наиболее часто применяют следующий метод оценки количества сперматогоний в семенниках мелких лабораторных животных. Данный метод заключается в подсчете числа сперматогоний с учетом стадии сперматогенеза каждого выбираемого для анализа среза семенного канальца и отнесения результатов подсчетов к соответствующей стадии (9). Для этого готовят серийные срезы семенника, фиксированного в центер-формоле, окрашивают их шифф-йодной кислотой с докраской гематоксилином (для идентификации стадий каждого среза канальца по развитию акросомы сперматид). Подсчитывают количество сперматогоний типов А, ПР (промежуточных) и Б. Для каждой из 14 идентифицируемых у крысы стадий сперматогенеза просчеты проводят в 5-10 округлых канальцах. Недостатком метода является то, что он очень трудоемкий, требует высокой квалификации в работе с данным материалом и не дает полной картины заключительного этапа сперматогенеза.

При анализе научно-медицинской и патентной литературы нами не обнаружен способ, который мог бы явиться прототипом.

Задачей заявляемого изобретения является обеспечение возможности сравнительной оценки активности сперматогенеза у мелких лабораторных животных, упрощение способа, оценка процесса сперматогенеза на окончательном его этапе.

Поставленная задача решается путем внутрибрюшинного введения животным опытной и контрольной группы ³Н-тимидина в индикаторной дозе 0,5-1,0 млКи/г, разделив ее на 3 равные порции с интервалом введения 8-9 часов, с последующим забоем на 48-е сутки, исследованием придатков в жидкостном сцинтилляционном β-счетчике и сравнении среднего числа импульсов в единицу времени на единицу массы навески придатка в каждой группе.

ВУ 1951 С1

Способ осуществляют следующим образом. Животным (беспородным белым крысам массой 160-180 г) опытной и контрольной групп вводят внутривентриально ^3H -тимидин в индикаторной дозе 0,5-1,0 мКи/г, разделив ее на три равные порции с интервалом введения 8-9 часов. На 48-е сутки животных одновременно забивают и берут для исследования придатки. После фиксации в 10%-ном растворе формалина придатки исследуют автордиографически для исключения случайных патологических процессов. Затем исследуемые органы промывают в течение 1 суток проточной водой, обсушивают, делают навески по 10-12 мг и заливают 8-10-кратным объемом тканевого солиобилизера СЕРВА и помещают в термостат при 56-58°C до полного растворения ткани. После этого к растворенной смеси добавляют раствор сцинтиллятора (6,0 г ПОП-2,5-дифенилоксазол сцинтилляционный и 0,6 г ПОПОП - 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазолин бензол) сцинтилляционный на 1000,0 мл толуола особой чистоты для спектроскопии) до объема 10 мл и помещают в жидкостный сцинтилляционный счетчик "БЕТА-2". Сравнивают среднее число импульсов в единицу времени (1 мин) на единицу массы ткани придатка (1 мг) в обеих группах и делают вывод об активности сперматогенеза.

Обоснование параметров способа

Для процесса сперматогенеза на начальных его этапах обязательным условием является митотическое деление сперматогенной ткани с предварительным синтезом ДНК. Тимидин единственный из четырех нуклеозидов, участвующих в образовании полинуклеотидной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), который характерен только для молекулы ДНК. Поэтому меченый тимидин используется клеткой исключительно для синтеза ДНК, являясь ее специфическим предшественником. Высокая избирательность включения ^3H -тимидина в ДНК была продемонстрирована в специально проведенных радиоавтографических исследованиях. Существенным обстоятельством при этом является стабильность "метки", которая может быть "разбавлена" лишь в ходе последовательных клеточных делений (6). Именно поэтому животным вводили ^3H -тимидин. Индикаторная доза 0,5-1,0 мКи/г, разделенная на три равные порции и интервал введения 8-9 часов обоснованы, основываясь проведенными ранее исследованиями (2). Из литературных (5) и наших данных (3) известно, что процесс сперматогенеза равен 48 суткам, по истечении которых спермии поступают в придаток. Исходя из этого, животные забиваются одновременно на 48 сутки, для исследования берут придатки.

Для подтверждения эффективности заявляемого способа приводим пример сравнительной оценки активности сперматогенеза у двух групп беспородных белых крыс. Опытную группу составили 7 животных, которым проводилась активация сперматогенеза инфракрасным лазерным излучением аппаратом "УЗОР" со следующими параметрами: экспозиция 128 секунд, длина волны 890 нм, частота импульсов 600 Гц в течение трех суток (1). Контрольную группу составили 7 интактных крыс. Дальнейшая обработка материала проводилась по вышеизложенной методике.

По количеству импульсов в 1 мин на 1 мг ткани судят об активности сперматогенеза. Этот показатель у животных опытной группы достоверно выше в сравнении с контролем. Полученные результаты приведены в таблице.

№ п.п.	Число импульсов в 1 мин на 1 мг ткани	
	Опыт	Контроль
1	452,7	145,7
2	436,2	202,4
3	428,4	248,6
4	355,2	207,7
5	389,5	174,4
6	412,7	247,0
7	431,8	244,5
M±m	415,20±12,50	210,00±15,05 *

* - достоверные различия с показателями контрольной группы

Таким образом, преимущество предлагаемого нами метода заключается в простоте исполнения, возможности проследить процесс сперматогенеза на различных стадиях и в полном объеме оценить его на конечном этапе. Этот метод может быть применен в работе с мелкими лабораторными животными для оценки процессов как активации, так и угнетения спермопродуцирующей функции.

Составитель А.И. Сорокин
Редактор В.Н. Позняк
Корректор Т.Н. Никитина