

БИОЛОГИЯ

УДК 611.013 + 591.4

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МАТОЧНОГО МОЛОЧКА ПЧЕЛ НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА КРЫС ПРИ ОСТРОМ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

© 2011 г. *Е.В. Крылова*¹, *Т.Е. Потемина*², *А.С. Корягин*¹, *Г.Д. Нестеров*^{1,2}

¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

²Нижегородская государственная медицинская академия

kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 05.10.2011

Изложены результаты исследования действия нативного маточного молочка пчел на некоторые показатели эякулята белых крыс в нормальных условиях и при профилактике острого теплового стресса. Показано стимулирующее и протективное действие маточного молочка на сперматогенез.

Ключевые слова: маточное молочко пчел, сперматогенез, тепловой стресс.

Введение

Сперматогенез является процессом, чутко реагирующим на неблагоприятные изменения среды, и который может быть определенным индикатором уровня адаптации организма [1]. Исходя из этого, адаптивные возможности организма к факторам внешней среды можно рассматривать через призму мужской системы размножения [2, 3]. Предупреждение и лечение нарушений репродуктивной системы, связанных с дезадаптацией и стрессовыми влияниями, является актуальной проблемой современной медицины [4, 5].

В настоящее время, несмотря на преобладание синтетических лекарственных препаратов для терапии и профилактики заболеваний, в мире развивается тенденция использования природных лечебных средств в силу отсутствия у них большого числа побочных отрицательных эффектов, а также в связи с невозможностью их подделки [6, 7]. Частью традиционной медицины – натуротерапии – является апитерапия [8, 9]. Особое место среди продуктов пчеловодства занимает пчелиное маточное молочко. Согласно данным исследований [10–12], выявлены адаптогенные и биостимулирующие свойства маточного молочка.

Особенностью нативного маточного молочка является сверхвысокая концентрация всех необходимых организму органических и минеральных веществ, способных обеспечить форсированный метаболизм, направленный на раз-

витие структур и функций [13–16]. Ранее нами было показано положительное влияние маточного молочка на сперматогенез крыс при холодом [17] и иммобилизационном [18] стрессах. В настоящее время отсутствуют литературные данные о применении маточного молочка пчел с целью коррекции и профилактики половой дисфункции, вызванной острым тепловым воздействием.

Цель данной работы – экспериментальное изучение адаптогенного влияния маточного молочка пчел на некоторые показатели сперматогенеза белых крыс в норме и при профилактике острого теплового воздействия.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 75 беспородных половозрелых самцах белых крыс массой 200–250 г в возрасте от 4-х месяцев до 1 года, с однородными параметрами эякулята, соответствующими норме по литературным данным для этого вида животных [19].

Животные содержались в стандартных условиях вивария: при температуре +18 – +20°C, влажности 55–65%, 12-тичасовом световом дне и получали натуральный корм. Подопытные и контрольные животные содержались в одинаковых условиях.

Схема эксперимента предусматривала следующие серии по 15 животных в каждой:

1) интактная группа – крысы, находившиеся в общих условиях содержания и кормления;

2) контрольная группа 1 – крысы, подвергнутые острому тепловому стрессу (ОТС);

3) контрольная группа 2 – крысы, находившиеся в общих условиях содержания, получавшие нативное маточное молочко (ММ) в течение 10 дней;

4) опыт – крысы, получавшие нативное маточное молочко в течение 10 дней перед острым тепловым стрессом;

5) контрольная группа 1' – крысы, помещавшиеся в термокамеру без нагрева для контроля данных, полученных при моделировании острого теплового стресса;

Методы исследования

Для изучения спермограммы в условиях адаптации использовалась модель ОТС, создаваемого путем помещения крыс в термокамеру с температурой +40°C, на 30 минут, однократно [20].

Животные из групп «опыт» и «контроль 2» получали ежедневно перорально нативное маточное молочко в течение 10 дней в весовой дозе 100 мг/кг [7, 8]. Исследование эякулята у групп «опыт» и «контроль 1» проводилось спустя 1, 7, 14, 30 суток после острого теплового стресса; у групп «интактные», «контроль 1'» и «контроль 2» – параллельно в те же временные интервалы. Для исключения влияния суточного колебания уровня половых гормонов исследования проводились в одно и то же время суток в утренние часы [21].

Эякулят для исследований получали методом окситоциновой стимуляции (внутрибрюшинно в количестве 0.2 мл/животное). Полученный эякулят разводили физиологическим раствором с температурой 37°C до объема 2 мл, помещали в термостат при температуре 37°C на 30 минут. Затем 0.1 мл разведенного эякулята добавляли в пробирку, содержащую 0.9 мл физиологического раствора [19, 21]. Эякулят исследовали под световым микроскопом в камере Горяева. Проводилось исследование подвижности сперматозоидов в капле нативного эякулята на стекле. Общее количество анализируемых при этом клеток в каждой пробе равнялось 100. Раздельно учитывались сперматозоиды с активным поступательным движением (нормокинезис), совершающие колебательные движения (гипокинезис) и неподвижные сперматозоиды (акинезис) [19, 22]. Результаты выражались в процентах. Полученные данные были обработаны с помощью пакета *Microsoft Excel* и программы *Biostat*. Парные внутригрупповые сравнения средних определяли по *t*-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование показало, что у интактных животных на протяжении всего эксперимента количество сперматозоидов оставалось постоянным – $3.37 \pm 0.320 - 3.52 \pm 0.076$ млн. (табл. 1), что может свидетельствовать об адекватности выбранной методики получения эякулята.

У животных, получавших нативный препарат маточного молочка (опыт 1), на 1 сутки после окончания приема препарата количество клеток в эякуляте значительно превышало показатели интактных животных, достигая 6.38 ± 0.020 млн. Количество колеблющихся форм в процентном соотношении к общему числу клеток осталось без изменений, а количество подвижных гамет увеличилось более чем в 2.5 раза (табл. 1). Как следует из таблицы, на 7–30 сутки после окончания курса кормления количественные показатели эякулята статистически значимо увеличились и достигли 6.93 ± 0.060 млн.

Таким образом, показано, что маточное молочко является мощным биостимулятором и обладает активирующим воздействием на сперматогенез крыс в физиологических условиях, что выражается в статистически значимом увеличении количества клеток в эякуляте, по сравнению с интактной группой. Также отмечено положительное действие маточного молочка на качественные характеристики эякулята, выраженное в статистически значимом увеличении количества подвижных и колеблющихся гамет. Известно [16], что для нормального сперматогенеза требуется фолликулостимулирующий гормон, тестостерон и нормальное функционирование клеток Сертоли. Можно полагать, что компоненты маточного молочка, попадая в организм животных через хеморецепторные механизмы, приводят к активации гипоталамо-гипофизарной системы: повышению секреции гонадотропин-рилизинг гормона и выбросу в кровь фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Это приводит к активации синтеза тестостерона, усилению метаболизма клеток Сертоли и стимуляции сперматогенеза. Созревание сперматозоидов происходит в придатках семенников и в семявыносящих протоках. В протоках семенная жидкость обогащается фруктозой, а также цинком и кислой фосфатазой секрета предстательной железы. Данные литературы свидетельствуют, что маточное молочко богато цинком, кроме этого повышает уровень фруктозы в семенниках. Установлено, что содержание фруктозы в семенниках отражает андрогенный статус организма [16].

Можно полагать, что активация сперматогенеза маточным молочком осуществляется как

Таблица 1

Изменение спермограммы крыс при профилактике острого теплового стресса маточным молочком

Группа	Показатель	1 сутки	7 суток	14 суток	30 суток
Интактные	Общее количество	3.37±0.320	3.32±0.027	3.38±0.374	3.52±0.076
	Подвижные клетки	1.58±0.370	1.77±0.012	1.41±0.094	1.78±0.193
	Колеблущиеся клетки	0.63±0.053	0.67±0.170	0.68±0.387	0.71±0.260
Контроль 1 (ОТС)	Общее количество	5.20±0.0273•	2.35±0.095•	2.58±0.021•	2.56±0.460•
	Подвижные клетки	1.50±0.023•	0.630±0.045•	0.635±0.167•	0.72±0.090•
	Колеблущиеся клетки	0.64±0.026•	0.24±0.230•	0.19±0.342•	0.39±0.073•
Контроль 2 (ММ)	Общее количество	6.38±0.020#	6.45±0.072#	6.79±0.054#	6.93±0.060#
	Подвижные клетки	4.17±0.090#	4.12±0.145#	4.25±0.041#	4.40±0.450#
	Колеблущиеся клетки	1.21±0.320#	1.25±0.034#	1.54±0.270#	1.76±0.240#
Опыт (ММ+ОТС)	Общее количество	11.92±0.039*#•	9.72±0.036*#•	2.91±0.070*#•	3.27±0.017*#•
	Подвижные клетки	2.23±0.045*#•	1.78±0.020*#•	0.37±0.016*#•	0.53±0.033*#•
	Колеблущиеся клетки	4.37±0.130*#•	3.58±0.230*#•	0.84±0.031*#•	1.25±0.050*#•

* Статистическая значимость $p < 0.05$ по сравнению с интактными,

статистическая значимость $p < 0.05$ по сравнению с опытом,

• статистическая значимость $p < 0.05$ по сравнению с контролем 1.

через центральные механизмы (гипоталамо-гипофизарная система), так и на уровне семенных протоков и предстательной железы.

У группы животных, подвергнутых ОТС (опыт 2), на 1-е сутки после теплового воздействия произошло статистически значимое увеличение количества клеток в эякуляте до 5.20 ± 0.027 млн. по сравнению с интактной группой (табл. 1). Количество подвижных и колеблющихся гамет повысилось до 40.38% и 17.50% соответственно.

Известно, что экстремальная температура для крыс начинается от 40°C и выше [20]. Для неакклиматизированных животных она является неадекватной и ведет к стрессовым реакциям. На 7-е сутки количественные и качественные показатели эякулята крыс, перенесших тепловое воздействие, снизились более чем в 2 раза. Общее число гамет – 2.35 ± 0.095 млн, количество подвижных гамет при этом составило 0.92 ± 0.326 млн. (39.14%), а колеблющихся 0.67 ± 0.24 млн. (28.51%).

На 14-е сутки наблюдалась положительная динамика сперматогенеза, хотя значительных изменений как по количеству, так и по качеству

эякулята не происходило. Процентное соотношение между подвижными и колеблющимися формами сохранялось на уровне результатов предыдущего измерения: 36.43% и 26.74% соответственно.

На 30-е сутки положительная тенденция изменения показателей эякулята сохранялась. Общее число гамет – 2.96 ± 0.460 млн., из них подвижных форм 1.16 ± 0.064 млн., колеблющихся 0.87 ± 0.443 млн., что составило 39.20% и 29.30% соответственно.

Таким образом, показано, что острый тепловой стресс вызывает в первые сутки значительное увеличение общего числа сперматозоидов в семенной жидкости. Но данные изменения носят кратковременный характер и, возможно, связаны с возникающей артериальной гиперемией мошонки вследствие перегревания и активацией обменных и защитных механизмов репродуктивной системы. При тепловом стрессе в клетках образуются белки теплового шока [23], задача которых состоит в защите клеточных белков от денатурации. Усиление синтеза белков теплового шока индуцируется катехоламинами и кортикостероидами. Поскольку стрес-

Таблица 2

Динамика спермограммы крыс (млн. клеток) в нормальных условиях и после острого теплового воздействия (40°C / 30 мин)

Группа	Показатель	1 сутки	7 суток	14 суток	30 суток
Интактные	Общее количество	3.37±0.320	3.32±0.027	3.38±0.374	3.52±0.076
	Подвижные клетки	1.58±0.370	1.77±0.012	1.41±0.094	1.78±0.193
	Колеблющиеся клетки	0.63±0.053	0.67±0.170	0.68±0.387	0.71±0.260
Контроль 1 (ОТС)	Общее количество	5.20±0.0273*	2.35±0.095*	2.58±0.021*	2.56±0.460*
	Подвижные клетки	1.50±0.023*	0.63±0.045*	0.64±0.167*	0.72±0.090*
	Колеблющиеся клетки	0.64±0.026*	0.24±0.230*	0.19±0.342*	0.39±0.073*
Контроль 1' (нормотермия)	Общее количество	3.36±0.419#	3.29±0.301#	3.40±0.340#	3.49±0.556#
	Подвижные клетки	1.49±0.070#	1.97±0.052#	1.59±0.041#	1.84±0.020#
	Колеблющиеся клетки	0.72±0.220#	0.85±0.150#	0.76±0.017#	0.85±0.177#

* Статистическая значимость $p < 0.05$ по сравнению с интактными.

статистическая значимость $p > 0.05$ по сравнению с интактными.

сорное воздействие было однократным, адаптационной стабилизации структур не происходило и, начиная с 7-х суток, наблюдалось статистически значимое по сравнению с интактными животными уменьшение общего количества и снижение подвижности гамет. Данные, полученные у группы «контроль 1'», статистически значимо не отличались от показателей группы «интактные», следовательно, факт пребывания в термокамере с комнатной температурой не оказал влияния на показатели эякулята белых крыс (табл. 2).

Резко различалась динамика показателей эякулята животных в группе опыта. По сравнению с контрольной группой, после профилактики маточным молочком на 1-е сутки после ОТС наблюдалось достоверное увеличение общего количества клеток в эякуляте до 11.92 ± 0.039 млн., из них подвижные формы составили 18.70%, колеблющиеся – 36.66% соответственно (табл. 1).

На 7-е сутки количество сперматозоидов в эякуляте начало уменьшаться и составило 9.72 ± 0.036 млн.; количество подвижных и колеблющихся форм не изменилось относительно общего количества сперматозоидов.

На 14-е сутки было выявлено резкое ухудшение наблюдаемых характеристик эякулята: количество сперматозоидов составило 2.91 ± 0.070 млн., из них подвижных гамет – 12.71% и колеблющихся – 28.86%. К 30-м суткам наблюдалась тенденция к восстановлению качества и количества клеток, что выражалось в уве-

личении количества сперматозоидов до 3.39 ± 0.10 млн., из них подвижные формы составили 15.63%, колеблющиеся – 36.87%, что превысило показатели 14-х суток. Эти показатели статистически значимо отличались от контроля с ОТС и приближались к показателям интактных животных.

В результате проведенных исследований нами выявлено, что маточное молочко оказывает протективное действие на сперматогенез крыс. Это выразилось в статистически значимом увеличении общего количества клеток, их подвижных и колеблющихся форм по сравнению с интактными крысами и с крысами, получавшими маточное молочко в нормальных условиях. Высокие показатели качественных и количественных характеристик эякулята сохранялись на протяжении первых 7 суток после ОТС. Возможно, это объясняется как стимулирующим действием маточного молочка на процессы сперматогенеза, предшествовавшего тепловому стрессу, так и усилением выхода клеток в эякулят под действием высокой температуры, что подтверждается сравнением с данными группы «контроль 1» для аналогичного времени исследования. Затем к 14 суткам наблюдалось снижение количества всех форм спермиев, что указывает на повреждающее действие теплового стресса, но и это количество клеток оказалось статистически достоверно выше, чем в группе «контроль 1». Таким образом, можно заключить, что маточное молочко, как средство для

стимуляции сперматогенеза, положительно проявило себя и в условиях такого серьёзного стресса, как гипертермия. Оно позволило не только сохранить количество и качество гамет по сравнению с интактными животными, но и значительно увеличить показатели, сопоставимо с данными группы крыс, получавших маточное молочко и не подвергнутых действию гипертермии.

Выводы

1. Выявлено положительное влияние маточного молочка на количественный состав эякулята и подвижность спермиев в нормальных условиях. Установлено значительное увеличение общего числа сперматозоидов (на 95%) и повышение их подвижности в 2.5 раза по сравнению с интактными животными.

2. Острое тепловое воздействие вызывает значительные функционально-морфологические изменения семенной жидкости крыс: увеличение общего числа гамет на 65% в 1-е сутки после теплового воздействия, а к 7 суткам – уменьшение общего числа гамет на 36% и снижение их подвижности более чем в 2.5 раза.

Тенденция к восстановлению количественного и качественного состава эякулята выявляется только к 30 суткам, не достигая показателей интактных животных.

3. Применение маточного молочка как средства профилактики стрессорного теплового воздействия оказывает протекторное действие на сперматогенез. Показано статистически значимое увеличение количества и качества гамет в эякуляте крыс на протяжении 7 суток после воздействия и сохранение их на более высоком уровне до конца эксперимента, по сравнению с группой животных, подвергнутых тепловому стрессу.

Список литературы

1. Влияние внешних факторов на мужскую репродуктивную систему / Под ред. Д.И. Рыжакова. Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2006. 28 с.
2. Артифексов С.Б., Потемина Т.Е. Регенерация, адаптация, гомеостаз. Горький: Изд-во ГМИ, 1990. 215 с.
3. Гаркави Л.Х. Использование принципов развития антистрессорных адаптационных реакций для разработки режимов применения физических факторов, повышающих резистентность организма // В сб.: Итоговые научные изыскания последнего года XX века. Москва, 2000. С. 332–336.
4. Pajarinen J.T. Spermatogenic arrest and Sertoli – only syndrome – common alcohol-induced disorders of the human testis // *Ind. J. Androl.* 1994. V. 17. P. 292–299.
5. Гаркави Л.Х. Активационная терапия. Антистрессорные реакции активации и тренировки и их использование для оздоровления, профилактики и лечения. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 2006. 256 с.
6. Крылов В.Н., Вальцева И.А., Чебышев Н.В. Введение в апитерапию. М: Изд-во ММА им. И.М. Сеченова, 1998. 90 с.
7. Крылов В.Н., Сокольский С.С. Пчелиный кладезь здоровья. Краснодар: Изд-во администрации Краснодарского края, 1999. 92 с.
8. Крылов В.Н., Агафонов А.В., Кривцов Н.И., Лебедев В.И. и др. Теория и средства апитерапии. М.: Изд-во ООО ПКФ «Комильфо», 2007. 296 с.
9. Лудянский Э.А. Руководство по апитерапии. Вологда: Полиграфист, 1994. 459 с.
10. Xu Ming, Yuan Ze-liang, Xu Ling-yun. Extraction of 10-HDA from the filter residue of fresh royal jelly // *Abstr. XXXIII Congr. int. apicult.*, Beijing, 20–26 Sept. 1993. P. 389.
11. Вавилов Ю.Л. Биохимические компоненты маточного молочка медоносной пчелы и морфологическое их действие. Дис. ... канд. биол. наук. Горький: ГГУ им. Лобачевского, 1971. 141 с.
12. Корягин А.С., Ястребова Е.В., Крылов В.Н. Терапия лучевой болезни пчелиным ядом и солапивином // *Матер. 5-й конф. по апитерапии. Рыбное, 1997. С. 90–92.*
13. Baker S.A., Foster A.B., Lamb S.D. et al. Identification of 10-hydroxi-2-decenoic Acid in Royal Jelly // *Nature.* 1959. P. 996–997.
14. Blum M.S., Novak A.F., Taber S. 10-hydroxi-2-decenoic Acid, an Antibiotic Found in Royal Jelly // *Science.* 1959. V. 3. P. 452–453.
15. Брайнес Л.Н., Вахонина Т.В. О фракциях липидно-жировой компоненты препарата апилак (маточного молочка) // *Информационн. бюлл. о маточном молочке. Рыбное, 1974. Вып. 4. С. 91–97.*
16. Крылов В.Н., Сокольский С.С. Маточное молочко пчёл. Краснодар: Агропромполиграфист, 2000. 216 с.
17. Крылов В.Н., Потемина Т.Е., Верховская М.В., Гурылева А.В. Применение продуктов пчеловодства для коррекции нарушений сперматогенеза у крыс // *Матер. 13-й конф. по апитерапии. Рыбное, 2008. С. 56–59.*
18. Крылова Е.В., Потемина Т.Е., Верховская М.В., Гурылева А.В. Влияние маточного молочка на репродуктивную функцию самцов крыс при стрессе // *Матер. 14-й науч.-практ. конф. по апитерапии. Рыбное, 2009. С. 46–50.*
19. Рыжаков Д.И., Молодюк А.В., Артифексов С.Б., Прохорова А.А. Моделирование процессов эякуляции у крыс // *Деп. в ВИНТИ 30.03.84; № 1784–459.*
20. Ягин В.В. Эколого-физиологические аспекты термопротекторного действия зоотоксинов. Автореферат дис. ... д-ра биол. наук. Н. Новгород: ННГУ им. Лобачевского, 2007. 48 с.
21. Артифексов С.Б. Морфо-функциональное исследование половых клеток самцов белых крыс при гипотермии. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. Челябинск: Челябинский медицинский институт, 1981. 26 с.
22. Кузнецова С.В. Нарушение сперматогенеза при острой гипобарической гипоксии. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. Н. Новгород: НГМА, 2006. 21 с.
23. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. 288 с.

**PREVENTIVE EFFECT OF BEE ROYAL JELLY ON RAT SPERMATOGENESIS
INDICES DURING ACUTE HEAT STRESS**

E.V. Krylova, T.E. Potemina, A.S. Koryagin, G.A. Nesterov

The results of studies of native royal jelly action on some indices of the white rat ejaculate under normal conditions and in the prevention of acute heat stress are presented. A stimulating and protective effect of royal jelly on rat spermatogenesis is shown.

Keywords: bee royal jelly, spermatogenesis, heat stress.