

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ НА РАЗВИТИЕ ЯИЧЕК НОВОРОЖДЕННЫХ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Маслякова Г.Н.¹, Палатова Т.В.¹, Бучарская А.Б.¹, Медведева А.В.¹, Воронина Е.С.¹

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: iamnot88@bk.ru

Наиболее частой причиной патологических состояний плода и новорожденного является гипоксия, которая развивается при различных заболеваниях матери и плода и оказывает неблагоприятное влияние на развитие всех органов и систем. Антенатальное повреждение репродуктивной системы, обусловленное гипоксией, может быть необратимым и привести в постнатальном периоде к нарушению функции яичек, а в дальнейшем - к развитию первичного бесплодия. Цель исследования – оценить влияние хронической гипоксии на развитие половых желез плодов крыс в эксперименте. Было проведено изучение влияния хронической гипоксии на течение беременности и развитие яичек у крыс. В результате проведенных исследований было установлено, что гипоксия в антенатальном периоде негативно влияет на количество и соматометрические показатели новорожденных крысят. При гистологическом исследовании ткани яичек наблюдалось достоверное снижение количества канальцев в поле зрения, уменьшение диаметра и площади канальцев, при одновременном нарастании площади стромы в группе новорожденных крысят, подвергавшихся действию хронической гипоксии в антенатальном периоде. При иммуногистохимическом исследовании было отмечено снижение пролиферативного потенциала и увеличение экспрессии маркера апоптоза Bax в гоноцитах, клетках Лейдига и Сертоли у крысят опытной группы.

Ключевые слова: внутриутробная гипоксия, яички, иммуногистохимия, эксперимент.

INFLUENCE OF CHRONIC INTRAUTERINE HYPOXIA ON DEVELOPMENT OF TESTICLES OF NEWBORNS (EXPERIMENTAL STUDY)

Maslyakova G.N.¹, Palatova T.V.¹, Bucharskaya A.B.¹, Medvedeva A.V.¹, Voronina E.S.¹

¹Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: iamnot88@bk.ru

The most common cause of fetal and newborn problems is hypoxia, which develops with various diseases of the mother and fetus, adversely affects the development of all organs and systems. Antenatal damage of the reproductive system due to hypoxia can be irreversible and lead in the postnatal period to a dysfunction of the testicles, and further to the development of primary infertility. The aim of the study is to assess the effects of chronic hypoxia on the development of the sexual glands of the fetus of rats in the experiment. A study of the effect of chronic hypoxia on the course of pregnancy and the development of testicles in rats was conducted. As a result of conducted studies, it was found that hypoxia in the antenatal period negatively affects the number and somatometric parameters of newborn rats. Histological examination of the testicle tissue showed a significant decrease in a number of tubules in the field of vision, a decrease in diameter and space of the tubules, with simultaneous growth of the stromal space in the group of rats subjected to chronic hypoxia in antenatal period. In the immunohistochemical study, a decrease in proliferative potential and an increase in the expression of apoptosis marker Bax in gonocytes, Leydig and Sertoli cells in the rats of the experimental group were noted.

Keywords: intrauterine hypoxia, testes, immunohistochemistry, experiment.

По данным литературы, в нашей стране 4-4,5 млн супружеских пар (10-17%) бесплодны, при этом в половине случаев это связано с нарушением репродуктивного здоровья мужчин. Этиология мужского бесплодия разнообразна и классифицируется ВОЗ в 16 основных групп [1].

Значимыми факторами возникновения врожденных аномалий, крипторхизма, идиопатического бесплодия являются различные патологические состояния, развивающиеся во время беременности и влияющие на гонадогенез плода.

Наиболее частой причиной патологических состояний плода и новорожденного является гипоксия, которая развивается при различных заболеваниях матери и плода и оказывает неблагоприятное влияние на развитие всех органов и систем. Важное значение имеет антенатальное повреждение репродуктивной системы, так как последствия этого повреждения могут быть необратимы и привести в постнатальном периоде к нарушению функции яичек, а в дальнейшем - к развитию первичного бесплодия [2; 3].

Влияние хронической гипоксии на развитие половой системы в условиях эксперимента изучалось различными исследователями. Было установлено снижение массы тела и массы яичек новорожденных крысят по сравнению с контролем. При гистологическом исследовании отмечали интерстициальный отек, уменьшение размеров канальцев, очаговую дистрофию и атрофию сперматогенного эпителия, дистрофические изменения и нарушение функциональной активности клеток Лейдига [4].

В других работах отмечается, что в результате различных патологических состояний в яичках нарушаются процессы апоптоза и пролиферации, которые играют важную роль в процессах нормального развития и гомеостаза. В семенниках, в эмбриональном и раннем постнатальном периодах, они могут определить окончательный размер яичек взрослого и потенциал фертильности [5; 6].

Наиболее часто для изучения пролиферативной активности проводится иммуногистохимическое исследование белка Ki-67 - ядерного протеина, маркера пролиферативной активности, определяющегося во всех фазах клеточного цикла, кроме G₀. Ki 67 выявляет пролиферирующие клетки, находящиеся на разных фазах цикла, и таким образом отражает весь пул делящихся клеток, являясь наиболее надежным и четким маркером пролиферации [7].

Белок Вах - проапоптотический протеин, локализующийся в цитоплазме и выступающий как ингибитор роста. Известно, что белок Вах регулируется ядерным белком р53. Ген р53 является стресс-зависимым белком: в ответ на повреждение ДНК он тормозит смену фаз клеточного цикла или индуцирует апоптоз.

Данные по экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза в яичках новорожденных крыс под влиянием антенатальной гипоксии крайне малочисленны [5; 6].

Цель исследования – оценить влияние хронической гипоксии на развитие половых желез плодов крыс в эксперименте.

Материалы и методы

В экспериментальном исследовании было проведено изучение влияния хронической гипоксии на течение беременности и развитие яичек у крыс.

В основу разработки модели экспериментального исследования были положены

«Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [8], «Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [9].

Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу исследований в соответствии с Женевской конвенцией о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» (1985) и Хельсинкской декларацией (2000) о гуманном отношении к животным.

В работе были использованы 10 самок в возрасте от 4 до 10 месяцев белых беспородных крыс с массой 200 ± 30 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Лабораторные животные были разделены на 2 экспериментальные группы, по 5 самок в каждой. Первая (опытная) группа подвергалась гипоксии на протяжении всей беременности (21 день). Моделирование гипоксии проводилось в соответствии с методикой Н.Н. Каркищенко (2010). Вторая (контрольная) группа не подвергалась какому-либо воздействию на протяжении всей беременности.

Отсчет срока беременности начинался с момента обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке крысы. После родоразрешения взрослые животные выводились из эксперимента методом декапитации, новорожденные крысята на 1-е сутки жизни – методом цервикальной дислокации. Подсчитывалось количество крысят в помете и измерялась их масса тела. Был проведен забор яичек крысят-самцов для проведения морфологических исследований.

Морфологическое исследование. Яички крысят фиксировали в забуференном нейтральном 10%-ном формалине (рН=7,2; от 5 до 24 часов); дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации, заливали в парафин. Срезы тканей яичка толщиной 4–5 мкм помещали на предметные стёкла и депарафинировали согласно принятой стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и использовали для иммуногистохимического окрашивания (ИГХ).

В десяти полях зрения каждого случая в яичках был проведен подсчет следующих показателей: количество канальцев, количество клеток в канальцах, количество сосудов в строме, количество клеток Лейдига, диаметр канальцев, площадь паренхимы и стромы.

Иммуногистохимический метод (ИГХ). После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ-исследование согласно протоколу иммуногистохимического окрашивания. В качестве системы визуализации использовали REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, USA). В качестве детекционной системы применяли систему LSAB2 System, HRP (K0675) фирмы Daco, в качестве хромогена – диаминобензидин (Daco). В работе использовали следующие антитела: Monoclonal Rabbit

Anti- Ki67 antibody - фирма abcam (разведение 1:100); Monoclonal Mouse anti Vax antibody - фирма abcam (разведение 1:50).

Оценка иммуногистохимических реакций базировалась на визуальной оценке интенсивности окрашивания и подсчета количества иммунопозитивных (положительных) клеток.

Индекс пролиферации и апоптоза определяли путём подсчета количества Ki-67 и Vax-позитивных ядер на 100 клеток соответствующих структур (половые клетки, клетки Сертоли, клетки Лейдига) во всех группах при увеличении $\times 774$ с последующим вычислением показателя в процентах.

При статистическом анализе полученных результатов использовались пакеты компьютерных программ IBM SPSS Statistics 24.0, Microsoft Office Excel 2007.

При проверке выборочных совокупностей исследуемых величин на нормальность распределения по методу Колмогорова-Смирнова было выявлено, что распределение исследуемых параметров отличается от нормального, поэтому для сравнительного анализа использовали методы непараметрической статистики с расчетом медианы, межквартильного размаха, уровней достоверности различия между группами по критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

При проведении исследования потомства количество крысят в помете в группах различалось незначительно. Так, в опытной группе среднее количество крысят составило 17, в контрольной – 21 (таблица). Отмечалось снижение массы тела у потомства ($M_e - 5.8$) опытной группы по сравнению с контрольной ($M_e - 6.4$).

При обзорной световой микроскопии ткани яичек первой и второй групп морфологическая картина существенно не отличалась (рис. 1А). Снаружи яички были покрыты толстой соединительнотканной капсулой – белочной оболочкой. Деление ткани яичек на дольки отсутствовало. Извитые семенные каналы имели овальную и округлую форму. Клетки в каналах располагались хаотично, просвет отсутствовал. Среди сперматогенного эпителия, представленного поддерживающими клетками и подтипами половых клеток, обращали на себя внимание крупные округлые клетки с большим ядром и розовой цитоплазмой – гоноциты (рис. 1Б).

Между каналами располагалась нежно-волокнистая соединительная ткань (рис. 1В). В центральных отделах яичка отмечалась разреженность стромы различной степени выраженности за счет отека. Некоторые поля зрения были представлены только стромальным компонентом, каналы отсутствовали (60х).

При анализе морфометрических показателей (таблица) было выявлено, что диаметр

канальцев в опытной группе был меньше ($Me - 0,0435$), чем в контрольной группе ($Me - 0,0510$). При измерении площади паренхимы и стромы также были выявлены различия в группах. Так, площадь канальцев в первой группе была меньше ($Me - 0,0109$) по сравнению с контрольной группой ($Me - 0,0120$). В отношении стромального компонента отмечалась обратная зависимость ($Me - 0,0101$ и $0,009$ соответственно).

По результатам непараметрического теста Манна-Уитни были выявлены достоверные отличия в первой и второй группах по следующим параметрам: масса плодов ($p < 0,005$), диаметр канальцев ($p < 0,005$), площадь канальцев ($p < 0,005$), площадь стромы ($p < 0,005$), количество канальцев в поле зрения ($p < 0,01$).

Морфометрические показатели яичек новорожденных крысят

Количественные характеристики	1-я группа - гипоксия (медиана, процентиля)	2-я группа - контроль (медиана, процентили)
Количество канальцев в п/зр, увеличение 774	3 [2,75;3,25]*	4 [3,5;5,0] *
Количество клеток в канальцах в п/зр, увеличение 774	23 [19;27]	21 [16,25; 25,25]
Количество сосудов в строме в п/зр, увеличение 774	4 [3;4,5]	3 [2,25; 5,75]
Количество клеток Лейдига в п/зр, увеличение 774	13 [11,5;20,0]	11 [9,25;17,0]
Диаметр канальцев, мм в п/зр, увеличение 774	0,0435 [0,0358;0,0470]**	0,0510 [0,047;0,0535] **
Площадь канальцев, мм ² в п/зр, увеличение 774	0,0109 [0,0096;0,0119]**	0,0120[0,0116;0,0138] **
Площадь стромы, мм ² в п/зр, увеличение 774	0,0101 [0,0091;0,0114]**	0,009[0,0073;0,0095] **
Количество крысят в помете	17	21
Масса плодов, г	5,8 [5,735;6,505]**	6,4 [6,0875; 6,6475] **

Примечание: различия достоверны: * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,005$.

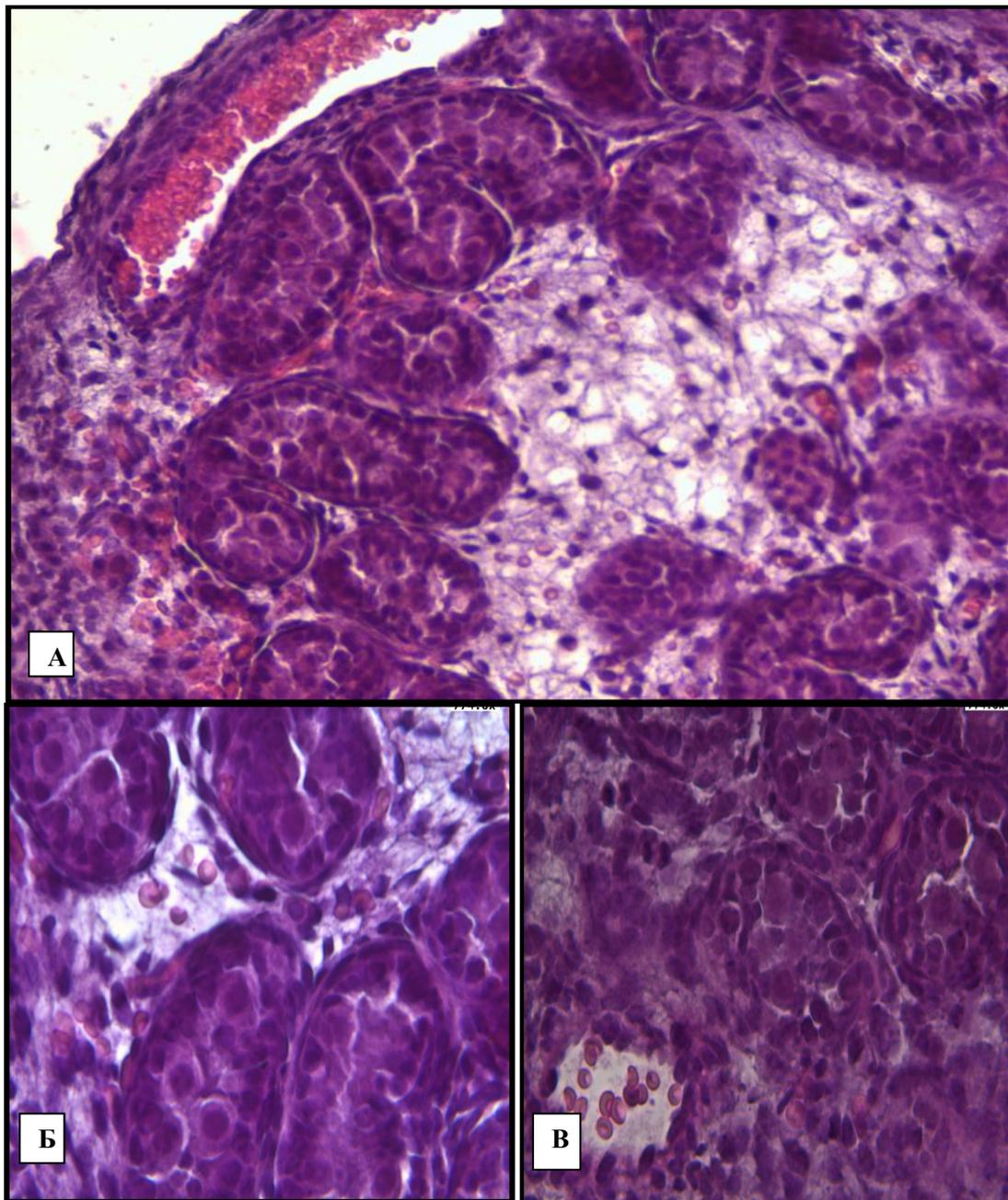


Рис. 1. Ткань яичка. А - ткань яичка контрольной группы, выраженная капсула, крупные сосуды, очаговый интерстициальный отек стромы. Гематоксилин-эозин, ув. 246.4. Б - ткань яичка контрольной группы, просвета в канальцах нет, отмечаются крупные клетки – гонициты. Гематоксилин-эозин, ув. 774. В - ткань яичка 1-й группы (гипоксия), фиброз, отсутствие просвета в канальцах. Гематоксилин-эозин, ув. 774

При анализе данных иммуногистохимического исследования (рис. 2) экспрессия Ki-67 (маркера пролиферации) в гоницитах, клетках Сертоли и клетках Лейдига в первой (контрольной) группе составила 36,65%, а во второй группе – 43,2%. Экспрессия Вах (маркера апоптоза) в первой группе составила 84,3%, а во второй (контрольной) группе – 71,7%.

Отмечается снижение экспрессии маркера пролиферации и увеличение экспрессии

маркера апоптоза в опытной группе, но, вероятно, за счет небольшого количества наблюдений данные различия не достоверны.

Необходимо отметить, что, несмотря на то что Вах является цитоплазматическим маркером апоптоза, мы наблюдали его ядерную экспрессию в гоноцитах, клетках Сертоли и клетках Лейдига.

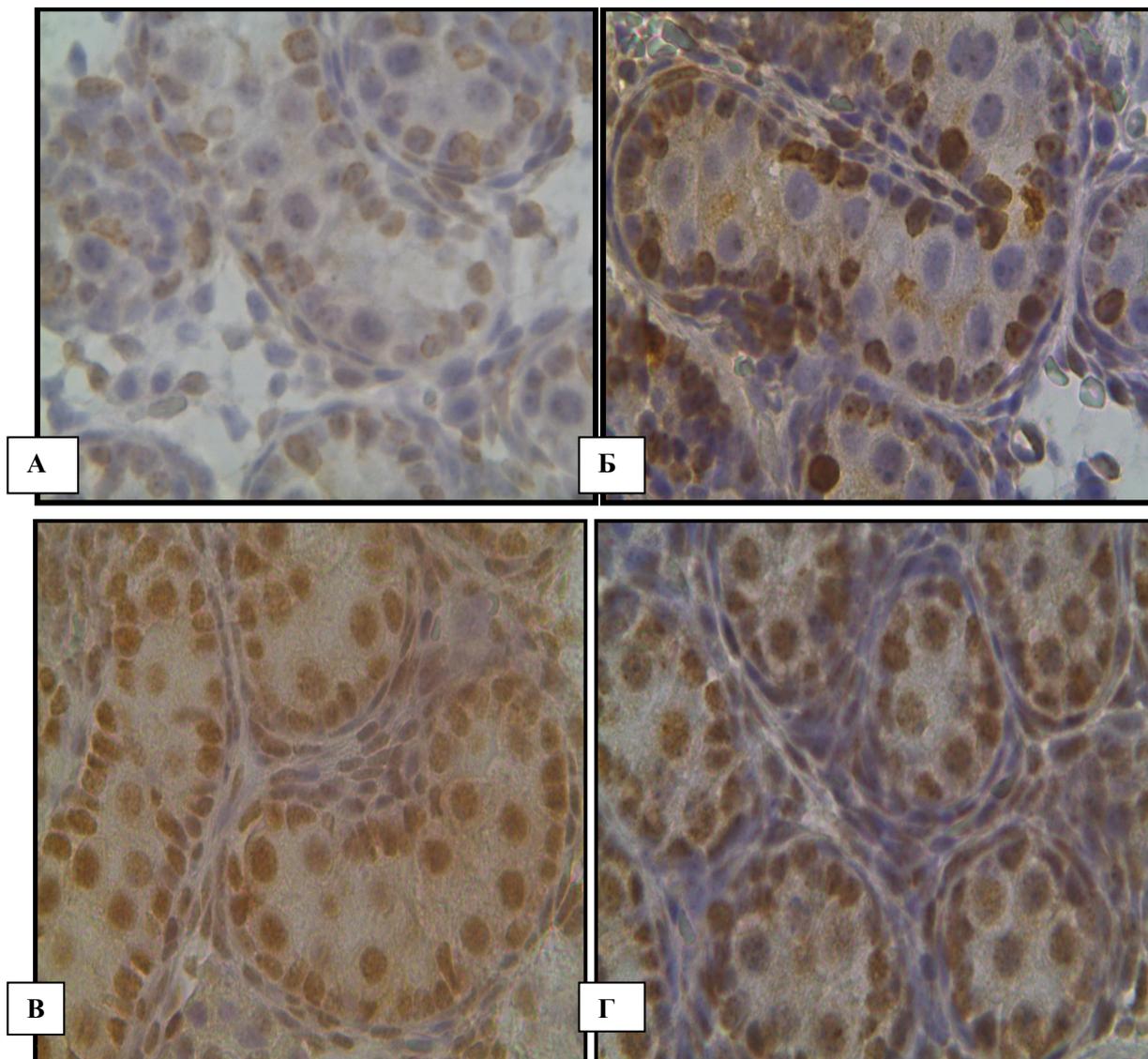


Рис. 2. Ткань яичка. А, Б - ИГХ-метод с маркером пролиферации (Ki-67), ув. 774. А - 1-я группа (гипоксия), Б - 2-я группа (контроль). В, Г – ИГХ-метод с маркером апоптоза (Вах), ув. 774. В – 1-я группа (гипоксия), Г – 2-я группа (контроль)

В литературе имеются данные, что белок Вах также может накапливаться внутри ядра вскоре после физиологического запуска апоптоза [7].

Обсуждение

Анализ результатов эксперимента позволил установить, что кислородная недостаточность оказывает неблагоприятное влияние на течение беременности и

последствия для развивающегося организма.

Данные о влиянии хронической гипоксии на плодовитость самок крыс в литературе противоречивы. В работе Черкесовой Д.У. и соавт. [10] при моделировании хронической внутриутробной нитритной гипоксии индекс плодовитости самок крыс в контрольной и опытной группах имел сопоставимые значения. Другие исследователи [2] выявили достоверное снижение количества крысят в помете в исследуемой группе и отметили, что хроническая гипоксия, развившаяся в первом триместре беременности, наиболее сильно влияет на количество потомства.

Результаты исследований Марковского В.Д. и соавт. [2] убедительно показали, что в случаях моделирования хронической внутриутробной гипоксии в большинстве случаев у потомства отмечается достоверное снижение массы тела, длины тела и хвоста.

Наши данные по снижению массы новорожденных крысят согласуются с данными других авторов. В нашем исследовании мы отметили снижение количества новорожденных крысят в потомстве самок с гипоксией, но достоверного отличия с контрольной группой не было выявлено, вероятно, из-за небольшого количества наблюдений по группам.

В исследованиях ряда авторов ранее были отмечены дистрофические и некробиотические изменения сперматогенного эпителия канальцев, а также склеротические изменения и уменьшение численности клеток Лейдига под влиянием гипоксии [4].

В нашем исследовании мы отметили уменьшение размеров канальцев, уменьшение площади паренхимы и увеличение площади стромы в исследуемой группе. Изменений со стороны клеток Лейдига при обзорных методах окраски мы не наблюдали.

При иммуногистохимическом исследовании нами было отмечено снижение пролиферативного потенциала и увеличение экспрессии маркера апоптоза в гоноцитах, клетках Сертоли и Лейдига у потомства крыс с гипоксией. Наши данные согласуются с данными других авторов [5], которыми было отмечено увеличение экспрессии маркеров апоптоза в клетках Сертоли, Лейдига и половых клетках при изучении особенностей семенников плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что гипоксия в антенатальном периоде негативно влияет на количество и соматометрические показатели новорожденных крысят в потомстве. Отмечено достоверное снижение массы крысят в помете при моделировании хронической гипоксии.

При гистологическом исследовании ткани яичек наблюдалось достоверное снижение количества канальцев в поле зрения, уменьшение диаметра и площади канальцев, при одновременном нарастании площади стромы в группе крысят, подвергавшихся действию

хронической гипоксии в антенатальном периоде. При иммуногистохимическом исследовании было отмечено снижение пролиферативного потенциала и увеличение апоптоза гоноцитов, клеток Лейдига и Сертоли у крысят опытной группы, но данные различия не были достоверными. Это свидетельствует о задержке и нарушении развития ткани яичек в условиях гипоксии уже в антенатальном периоде.

Перспективы дальнейшего исследования проблемы формирования репродуктивной системы при действии хронической антенатальной гипоксии мы видим в детальном изучении механизмов повреждения фетальных тестикул, которые могут спровоцировать проблемы в репродуктивной сфере и лечь в основу мужского бесплодия.

Список литературы

1. Тавокина Л.В. Мужское бесплодие. Генетические аспекты // Почки. – 2014. - № 2. - С. 9-13.
2. Марковский В.Д., Сорокина И.В., Мирошниченко М.С. и др. Влияние хронической внутриутробной гипоксии и инфекционной патологии матери на соматометрические показатели новорожденных (экспериментальное исследование) // Здоровье - основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2014. – Т. 9, № 2. - С. 659-661.
3. Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Серкова А.А. Современное представление о развитии и патологии яичек плода // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2015. – Т. 11, № 4. - С. 511-514.
4. Саяпина И.Ю., Целуйко С.С. Динамика количественных показателей клеток Лейдига при адаптации организма к низким температурам // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. - № 2. - С. 84-87.
5. Потапов С.Н., Яковцова А.Ф. Иммуногистохимические особенности семенных желез плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией // Проблемы эндокринной патологии. - 2010. - № 1. - С. 68-76.
6. Dundar M., Kocak I., Culhaci N. Determination of apoptosis through bax expression in cryptorchid testis: an experimental study // Pathol Oncol Res. 2005. 11 (3). P. 170-173.
7. Zhao W., Zhang B., Guo X. Expression of Ki-67, Bax and p73 in patients with hilar cholangiocarcinoma // Cancer Biomark. – 2014. – 14 (4). – P. 197-202.
8. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Медицина, 2005. – 835 с.
9. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. - М.: Профиль, 2010. – 358 с.

10. Черкесова Д.У., Магомедгаджиева Д.Н., Рабаданова А.И. Функциональные изменения в системе мать-плод при экспериментальной хронической нитритной гипоксии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. - 2009. – Т. 11, № 1-5. - С. 934-937.