РАЗДЕЛ I. МЕДИЦИНА

Антонов С.Д., Брюхин Г.В.

Фрагментация ДНК сперматозоидов потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
(Россия, Челябинск)

doi: 10.18411/scienceconf-05-2020-01

idsp: scienceconf-05-2020-01

Аннотация

Проведен анализ уровня фрагментации ДНК сперматозоидов потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа. Установлено, что у потомства подопытных животных помимо снижения суммарного содержания сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной суспензии имеет место повышенный уровень фрагментации их ДНК, а так же происходит увеличение числа атипичных форм сперматозоидов. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа имеет место нарушение фертильности.

Ключевые слова: сахарный диабет, эксперимент, сперматозоиды, жизнеспособность, фрагментация ДНК.

Abstract

The analysis of the level of DNA fragmentation of spermatozoa of the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes was carried out. It was found that in the offspring of experimental animals, in addition to reducing the total sperm content in 1 ml of the epididymal suspension, there is an increased level of fragmentation of their DNA, as well as an increase in the number of atypical forms of spermatozoa. The data obtained allow us to conclude that fertility is impaired in the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, animal experimentation, spermatozoa, DNA fragmentation

Актуальность

В настоящее время нарушениям отцовского генома уделяется все большее внимание в репродуктивной медицине. Нарушение мужской репродуктивной функции может быть связано с такими генетическими факторами, как генные мутации, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина. Фрагментация ДНК сперматозоидов – относительно недавно открытая причина мужского бесплодия, которая интенсивно исследуется в последнее десятилетие [1]. Вместе с тем, роль экстрагенитальной патологии матери, в частности сахарного диабета, в повреждении генетического материала потомства практически не изучена.

Цель

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явился анализ уровня фрагментации ДНК сперматозоидов половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Материал и методы

Работа выполнена на белых лабораторных крысах линии «Вистар». Для достижения поставленной цели у взрослых половозрелых крыс (самок) до беременности моделировали сахарный диабет 1 типа по общепринятой методике с использованием стрептозотоцина [2], который вводился животным внутривенно

трижды с интервалом 7 дней (по 2.5 мг на 100 г массы в первую и в третью недели и 2 мг на 100 г массы во вторую неделю). Всего за весь курс 10 лабораторных животных с массой от 230 до 256 г получали по 17 мг стрептозотоцина, под влиянием которого у лабораторных животных развивался сахарный диабет, о чем свидетельствовал постоянный повышенный уровень содержания сахара в крови (32.56 ± 2.44 ммоль/л), который сохранялся на протяжении, как минимум, трех месяцев. Подсадка к интактным самцам для спаривания проводилась через 1 неделю после последнего введения стрептозотоцина. В результате рождались подопытные крысы, эту группу составили 10 крысят из 10 пометов. Группу «контроль» составили 10 крыс из 9 помётов.

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986 г. Экспериментальных животных содержали в стандартных условиях вивария ЮУГМУ. Эвтаназия животных проводилась методом декапитации под эфирным наркозом.

Объектом исследования явилось половозрелое потомство мужского пола (70-ти дневное) самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, разрезая его вдоль в среде дозированного количества 5% раствора глюкозы (в объеме 1 мл), предварительно подогретого до 37°C . Затем отрезком отмытой резиновой трубки сперматозоиды из эпидидимиса активно перемещали в раствор в течение 2 минут. Определяли суммарное содержание сперматозоидов в единице объема (1мл) эпидидимальной суспензии [3]

Для оценки патологических форм сперматозоидов часть полученной суспензии смешивали с 1% раствором эозина Y в соотношении 1:10, затем спустя 30 минут готовили мазки, которые после просушивания на воздухе фиксировали метиловым спиртом и подвергали микроскопии. Подсчитывалось на 200 клеток процентное содержание сперматозоидов с дефектами головки, шейки, средней части и хвостика [3]. Кроме того, для оценки повреждения генетического материала проводили определение ДНК-фрагментации сперматозоидов по общепринятой методике с помощью Sperm Chromatin Dispersion (SCD) теста.

Все полученные результаты обработаны с использованием программного пакета Statistica v.6,0 («Statsoft Inc.») и представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки. Учитывая небольшой количественный состав групп экспериментальных животных, для оценки достоверности использовались непараметрические методы анализа: порядковые признаки между двумя группами – критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми изменения считали при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Прежде всего, нами установлено, что у подопытных животных имеет место снижение суммарного содержания сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной суспензии. Так, если у интактных животных исследуемый показатель составил $139 (122; 149) \times 10^6$, то у подопытных крысят он оказался значительно ниже и составил всего $95 (82; 111) \times 10^6$. Обращает на себя внимание, что на фоне снижения уровня концентрации сперматозоидов у подопытных животных отмечается увеличение числа патологических форм сперматозоидов. У животных контрольной группы содержание атипичных сперматозоидов составило 2,78 (2,13; 4,84) % (4,00 (3,00; 7,00) млн в 1 мл), у подопытных крыс исследуемый показатель увеличился до уровня 14,47 (12,20; 18,37) % (15,5 (11,00; 17,00) млн в 1 мл).

Особый интерес представляют данные уровня ДНК-фрагментации сперматозоидов подопытных животных. Как видно из рисунка №1, уровень повреждения нуклеотидной цепи у животных опытной группы оказался выше (25,5 (20,5; 28,5) %), чем в группе сравнения (10,5 (6,0; 13,5) %).

Рисунок №1. Уровень фрагментации ДНК экспериментальных животных ($p < 0,001$).

Результаты исследования убедительно свидетельствуют, что у матерей с экспериментальным сахарным диабетом рождается потомство с нарушением становления мужской репродуктивной системы, о чем свидетельствует как уменьшение суммарного содержания сперматозоидов, повышение числа патологических форм и уровня фрагментации ДНК.

Известно, что на зародышевые клетки семенников оказывает влияние окислительный стресс. Ряд исследований показывает, что избыточное продуцирование плацентой активных форм кислорода (состояние окислительного стресса) наблюдается во время беременности, протекающей с осложнениями, такими как сахарный диабет, гестоз, эпилепсия, и сопровождается перегрузкой системы антиоксидантной защиты [4]. В то же время, согласно данным литературы [5, 6], повреждения ДНК часто связаны с окислительным стрессом, а введение антиоксидантов может снизить уровень фрагментации нуклеотидной цепи. Логично предположить, что выявленные нами изменения могут быть связаны именно с окислительным стрессом возникшем на фоне экстрагенитальной патологии матери (сахарного диабета), потомство которой наследует генетические нарушения, в данном случае повреждения ДНК сперматозоидов.

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют констатировать, что экспериментальный сахарный диабет 1 типа матери обуславливает у потомства угнетение фертильности, что проявляется в снижении общего числа сперматозоидов, увеличении их атипичных форм, в том числе сперматозоидов с фрагментацией ДНК.

Конфликт интересов отсутствует.

***

1. Феськов А.М., Феськова И.А., Жилкова Е.С., Чумакова Н.А., Сомова Е.В. Исследование фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с повышенным содержанием незрелых спермиев в эякуляте. «Світ медицини та біології», № 1, 2012. С.179-182.
2. Закирьянов А.Р., Плахотный М.А., Онищенко Н.А. и др. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2007; №4. С. 21-25

3. Тиктинский О.Л., Михайличенко В.В. Андрология. – СПб.: Медиа-Пресс; 1999.
4. Доброхотова Ю.Э., Иванова Т.А., Гуляева Н.В., Онуфриев М.В., Джобава Э.М., Гехт А.Б. Окислительный стресс в плаценте при физиологической и патологически протекающей беременности. Российский вестник акушера-гинеколога. Том: 8. Номер: 6. Год: 2008. С. 33-36.
5. Khadivi F., Razavi Sh., Hashemi F. Protective effects of zinc on rat sperm chromatin integrity involvement: DNA methylation, DNA fragmentation, ubiquitination and protamination after bleomycin etoposide and cis-platin treatment Theriogenology 142 (2020). С. 177-183
6. Руднева С.А., Брагина Е.Е., Арифудин Е.А., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Ермолаева С.А., Курило Л.Ф., Черных В.Б. Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза Андрология и генитальная хирургия. 2014. №4. С. 26-33.

Toure Ahmed Salahs¹, Матвеева Л.В.²

**Первый опыт хирургического лечения варикозной болезни нижних конечностей
в госпитале Benjamin Mкара Hospital, Dodoma, Tanzania**

¹*Benjamin Mкара Hospital
(Tanzania, Dodoma)*

²*Ульяновский государственный университет
(Россия, Ульяновск)*

doi: 10.18411/scienceconf-05-2020-02

idsp: scienceconf-05-2020-02

Актуальность: хроническая венозная недостаточность нижних конечностей — самая частая патология периферических сосудов. Варикозная болезнь вен нижних конечностей представляет собой высокораспространенную патологию в популяции населения разных стран мира [106]. Согласно Боннскому эпидемиологическому исследованию [161] среди взрослого населения только 9,6% не имеют признаков хронической венозной недостаточности (ХВН). Ряд исследователей отмечает, что в последнее десятилетие имеет место омоложение контингента больных, страдающих ХВН, при этом их временная и стойкая нетрудоспособность наносят обществу существенный экономический ущерб [116, 131]. Прогностически неблагоприятным является рост ХВН среди лиц моложе 40 лет. Поэтому ВБВНК следует рассматривать с позиции не только медицинской, но и социально-экономической проблемы. J.A. Jimenez Cossio (1995), сравнивая частоту развития заболевания среди этнических африканцев (0,5%) и их соплеменников, проживающих в США и в странах Европы (10 - 20%) опроверг представление только в наследственном факторе развития. В развитии ХВН не последнюю роль играют факторы внешней среды, особенности образа жизни и питания. С улучшением качества жизни на Африканском континенте отмечается увеличение встречаемости варикозной болезни.

Материал и методы: в госпитале BENJAMIN MKAPA HOSPITAL, DODOMA, TANZANIA с мая по сентябрь 2019г. обследовано 30 пациентов с ХВН. В лечебное учреждение они обратились по поводу сопутствующей патологии к хирургу или терапевту. Из них 21(70 %) мужчин и 9 (30 %) женщин. Средний возраст составил 48 +/- 5 лет. В этиологии ХВН выявлено: наследственный фактор 35%, длительная статическая нагрузка 65%. Длительность заболевания - от 20 до 35 лет. На оперативное лечение дали согласие 7 пациентов(5 мужчин и 2 женщины). У остальных не беспокоил выраженный болевой синдром, поэтому они решили лечиться консервативно. Перед операцией оценивался анализ основного заболевания, сопутствующая патология. Всем пациентам проводились общеклинические исследования крови. Предоперационное обследование включало ультразвуковое дуплексное сканирование (УЗДС) артерий и вен нижних конечностей для определения их диаметра и характера кровотока, проходимости и наличия рефлюкса (рис. 1) а также отмечали устье и перфорантные вены (рис.2).