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

**Влияние хронической внутриутробной гипоксии на репродуктивную систему
плода (экспериментальное исследование)**

*ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.
Разумовского»
(Россия, Саратов)*

doi:10.18411/sciencepublic-15-07-2019-03

idsp: sciencepublic-15-07-2019-03

Наиболее частой причиной патологических состояний плода и новорожденного является гипоксия, которая возникает при недостатке поступления кислорода в ткани. В зависимости от продолжительности воздействия различают острую или хроническую гипоксию. Острая гипоксия развивается как правило интранатально, тогда как хроническая сопровождает различные заболевания матери и плода и оказывает неблагоприятное влияние на развитие всех органов и систем.

Важное значение имеет антенатальное повреждение репродуктивной системы, поскольку последствия могут привести к нарушению функции яичек в постнатальном периоде [1; 2].

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 [1;3;4].

По всей видимости, гипоксия нарушает 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].

Одним из способов оценки состояния мужской половой системы может служить иммуногистохимическое исследование с определением маркеров пролиферации и апоптоза.

Наиболее часто для изучения пролиферативной активности исследуют белок Ki-67 - ядерный протеин, который выявляет пролиферирующие клетки, находящиеся на разных фазах цикла[6].

Белок Вах - проапоптотический протеин, локализующийся в цитоплазме и выступающий как ингибитор роста. 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. Имеются данные, что белок Вах также может накапливаться внутри ядра вскоре после физиологического запуска апоптоза [6].

При экспериментальном исследовании [5], цель которого состояла в том, чтобы определить экспрессию Вах в зародышевых клетках крыс с односторонним крипторхизмом, было выявлено повышение экспрессии его в крипторхизированных яичках. Была высказана роль апоптоза в потере зародышевых клеток.

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

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

Материалы и методы

В экспериментальном исследовании было изучено влияние хронической внутриутробной гипоксии на развитие яичек у крыс.

В основу разработки модели экспериментального исследования были положены «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [7], «Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [8].

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 (pH=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 работе использовали следующие антитела: Monoclonal Rabbit Anti- Ki67 (abcam, USA, разведение 1:100); Monoclonal Mouse anti Bax antibody (abcam, USA, 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 Bax- 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.

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 1). 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. Снаружи яички были покрыты 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 обращали внимание крупные округлые клетки с большим ядром и розовой цитоплазмой – гоноциты. Между каналами располагалась соединительная ткань с явлениями отека и мелкими кровоизлияниями. Некоторые поля зрения были представлены только стромальным компонентом, каналы отсутствовали (60х).

При анализе морфометрических показателей (таблица 1) было выявлено, что диаметр каналов в опытной группе был меньше ($M_e = 0,0435$), чем в контрольной группе ($M_e = 0,0510$). При измерении площади паренхимы и стромы также были выявлены различия в группах. Так, площадь каналов в первой группе была меньше ($M_e = 0,0109$) по сравнению с контрольной группой ($M_e = 0,0120$). В отношении стромального компонента отмечалась обратная зависимость ($M_e = 0,0101$ 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 каналов ($p < 0,005$), площадь каналов ($p < 0,005$), площадь стромы ($p < 0,005$), количество каналов в поле зрения ($p < 0,01$).

Таблица 1

Морфометрические показатели яичек новорожденных крысят

Количественные характеристики	1-я группа - гипоксия (медиана, процентиля)	2-я группа - контроль (медиана, процентиля)
Количество каналов в п/зр, увеличение 774	3 [2;4]*	4 [3;5] *
Количество клеток в каналах в п/зр, увеличение 774	23 [19;27]	21 [16; 25]
Количество сосудов в строме в п/зр, увеличение 774	4 [3;4,5]	3 [2; 5,75]
Количество клеток Лейдига в п/зр, увеличение 774	13 [11;20,0]	11 [9;17,0]
Диаметр каналов, мм в п/зр, увеличение 774	0,0435 [0,0358;0,0470]**	0,0510 [0,047;0,0535] **
Площадь каналов, 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: * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,005$.

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

Было отмечено 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.

Обсуждение

Анализ полученных результатов позволил установить, что хроническая гипоксия 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. [4] при моделировании хронической внутриутробной нитритной гипоксии индекс плодовитости самок крыс в контрольной и опытной группах имел сопоставимые значения. Другие исследователи [1] выявили достоверное снижение количества крысят в помете в исследуемой группе, снижение массы, длины тела и хвоста.

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 [3].

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 [9], 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.

1. 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)/ В.Д.Марковский и др.//Здоровье-основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2014. – Т.9-№2-С.659-661.

2. Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Серкова А.А. Современное представление о развитии и патологии яичек плода/Г.Н.Маслякова и др.//Саратовский научно-медицинский журнал.-2015.-Т11.-№4.-С.511-514.
3. Саяпина И.Ю., Целуйко С.С. Динамика количественных показателей клеток Лейдига при адаптации организма к низким температурам/И.Ю. Саяпина, С.С. Целуйко//Дальневосточный медицинский журнал.- 2011. - №2.-С.84-87.
4. Черкесова Д.У.,Магомедгаджиева Д.Н.,Рабаданова А.И. Функциональные изменения в системе мать-плод при экспериментальной хронической нитритной гипоксии/Д.У.Черкесова и др.//Известия Самарского научного центра Российской академии наук.Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки.-2009.-Т11.-№1-5.-С.934-937.
5. Dündar M, Koçak I, Culhaci N. Determination of apoptosis through bax expression in cryptorchid testis: an experimental study. Pathol Oncol Res. 2005.11(3). P. 170-173.
6. 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.
7. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У.Хабриев//М.: Медицина -2005.-835с.
8. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях/ Н.Н.Каркищенко, С.В. Грачев//М.:Профиль-2010.-358с.
9. Потапов С.Н., Яковцова А.Ф. Иммуногистохимические особенности семенных желез плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией/С.Н. Потапов, А.Ф. Яковцова//Проблемы эндокринной патологии.-2010.-№1.-С.68-76.

Фараджева С.С.

**Определение уровня корреляции полиморфизма генов и выраженности
висцерального ожирения и артериальной гипертензии у пациентов с сд2 в
популяции жителей республики Азербайджан**

*Азербайджанский Государственный Институт Усовершенствования
врачей им.А.Алиева*

doi:10.18411/sciencepublic-15-07-2019-04

ids: sciencepublic-15-07-2019-04

В настоящее время получены убедительные данные о влиянии данных генов на пищевое поведение. Расстройство пищевого поведения в виде переедания, развивающееся вследствие нарушения центральных регуляторных механизмов, способствует предпочтению гиперкалорийного питания и опосредованному им увеличению массы тела [1].

На развитие СД2 и висцерального ожирения влияет носительство полиморфизмов гена, ассоциированного с избыточной массой тела и ожирением, FTO rs9939609 и гена лептина LEP rs7799039. Гены FTO и LEP рассматриваются как синтропные для СД2 и ожирения. В популяции жителей Республики Азербайджан клинико-генетическое исследование ассоциации полиморфизмов генов FTO и LEP с СД2 и висцеральным ожирением было проведено впервые. Необходимо отметить, что данная популяция является полиэтнической. Главной этнической подгруппой являются азербайджанцы, проживающие на равнинной местности в более развитых социально-экономических условиях, с более высокой степенью урбанизации. Генетический анализ был выполнен также у представителей двух других этнических подгрупп – талышей и лезгин, проживающих в горных районах, расположенных соответственно в южном и северном регионах Азербайджана.

Цель – выявить этнические различия распространенности генетических полиморфизмов rs9939609 гена FTO, ассоциированного с избыточной массой тела и ожирением, а также rs7799039 гена лептина LEP и rs1137101 гена рецептора к лептину LEPR и оценить уровень корреляции с выраженностью висцерального ожирения и артериальной гипертензии (АГ) у пациентов с СД2 в популяции жителей Республики Азербайджан.