

На правах рукописи



Палатова Татьяна Васильевна

**Морфологические особенности яичек плодов при патологическом
течении беременности**

14.03.02 - Патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Маслякова Галина Никифоровна

Официальные оппоненты:

Михалева Людмила Михайловна - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», лаборатория клинической, патологической анатомии, заведующая лабораторией; «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына», директор

Казачков Евгений Леонидович - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» июня 2022 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время большое внимание уделяется снижению показателей здоровья населения, в том числе и репродуктивного. Так, доля бесплодных браков составляет 15%, при этом мужское бесплодие достигает 45-50% в общей структуре заболеваний репродуктивной системы [Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al., 2017]. В 30-40% случаев этиология мужского бесплодия остается не выясненной [Sadeghi M. R., 2015; Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al., 2017].

Большинство отечественных и зарубежных авторов считают причинами идиопатического бесплодия в патологии, влияющей на гонадогенез плода. Негативное влияние на развитие семенников в антенатальном периоде могут оказать вредные привычки и заболевания матери, нарушения маточно-плацентарного кровообращения, а также неблагоприятные воздействия окружающей среды [Фомина М.П., 2015; Кульченко Н.Г., 2016; Skakkebaek N.E. et al., 2016].

Самой распространенной патологией в период беременности является внутриутробная гипоксия плода [Марковский В.Д., Сорокина И.Д., 2014; Макацария А.Д., Бицадзе В.О., 2016; Кузнецов П. А, 2017].

Исследования, посвященные изучению морфофункциональных изменений в органах репродуктивной системы плода под действием гипоксии, немногочисленны и носят в основном экспериментальный характер, хотя именно внутриутробная гипоксия является наиболее частым повреждающим фактором. До настоящего времени окончательно не установлено, какие морфологические, морфометрические и иммуногистохимические изменения претерпевает репродуктивная система плода в условиях внутриутробной гипоксии.

Степень разработанности темы исследования

Проведенный обзор литературы по данной тематике показал, что структурные изменения семенников при патологическом течении беременности явились объектом изучения в многочисленных экспериментальных исследованиях [Марковский В.Д., Сорокина И.В. , 2014; Rampranini V., 2017]. В то же время значение гипоксии для развития и функции органов плода человека, и, в частности, его репродуктивной системы, изучено крайне недостаточно.

Цель исследования: по результатам комплексного морфологического исследования клинического и экспериментального материала выявить структурно-функциональные особенности изменения яичек у плодов, формирующиеся в условиях острой и хронической внутриутробной гипоксии.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологию и морфогенез структурных компонентов яичек у плодов человека (диаметр канальцев, количество клеток в канальцах, площадь паренхимы и стромы, количество клеток Лейдига) на разных сроках гестации, перенесших острую и хроническую внутриутробную гипоксию.
2. Выявить характер и динамику морфофункциональной активности яичек у плодов человека в разные сроки гестации при острой и хронической внутриутробной гипоксии с помощью иммуногистохимических (ИГХ) маркеров пролиферативной и апоптотической активности, рецепторов половых гормонов, фактора роста фибробластов, васкулоэндотелиального фактора.
3. Изучить морфологию яичек и определить их морфофункциональную активность у новорожденных крысят при моделировании внутриутробной гипоксии различного генеза на основании анализа выраженности экспрессии маркеров пролиферативной и апоптотической активности, фактора роста фибробластов.
4. Оценить характер морфологических и морфофункциональных изменений в яичках половозрелых крыс самцов, перенесших внутриутробную гипоксию различного генеза в эксперименте с помощью ИГХ маркеров пролиферативной и апоптотической активности, фактора роста фибробластов.

Научная новизна

На клиническом секционном материале установлено, что в условиях хронической гипоксии происходит негармоничное развитие всех структурных компонентов яичка, выражающееся в уменьшении диаметра канальцев, количества клеток в канальцах, повреждении сперматогенного эпителия, разрастании интерстиция.

Установлено, что в условиях хронической гипоксии снижается пролиферативная активность, усиливается апоптоз сперматогенного эпителия, повышается экспрессия васкулоэндотелиального фактора. Изменение гормональной активности проявляется в виде снижения экспрессии андрогенового рецептора и усилении экспрессии эстрогенового рецептора.

На различных экспериментальных моделях внутриутробной гипоксии установлены морфофункциональные нарушения становления репродуктивной системы у потомства крыс, сходные с аутопсийным материалом яичек плодов человека.

У новорожденных крысят при моделировании внутриутробной гипоксии (гемической и гипоксической) развиваются: дистрофия сперматогенного эпителия, уменьшение диаметра канальцев, нарастание перитубулярного отека, снижение пролиферативной активности

эпителия канальцев и экспрессии фактора роста фибробластов и усиление апоптотической активности.

На экспериментальном материале показано, что хроническая внутриутробная гипоксия оказывает дестабилизирующее влияние на ткань яичек в отдаленном периоде. Так, у половозрелых самцов, перенесших внутриутробную гипоксию в эксперименте, отмечаются: уменьшение диаметра канальцев, снижение индекса сперматогенеза, усиление апоптотической активности сперматогенного эпителия и ослабление пролиферативной активности и экспрессии фактора роста фибробластов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены морфометрические параметры развития яичек плодов у здоровых женщин и при различных состояниях, сопряженных с нарушением маточно-плацентарного кровообращения в различные сроки гестации.

Подобраны наиболее информативные иммуногистохимические маркеры, объективно характеризующие степень морфофункционального повреждения тканей яичек.

По результатам экспериментального исследования сопоставлены гистоморфометрические и иммуногистохимические показатели изменений в тканях яичек плодов, развивающихся на фоне гипоксии различного генеза и оценена возможность реализации этих изменений в нарушениях репродуктивной сферы половозрелых особей.

Методология и методы исследования

Методология работы построена на совокупности клинических, экспериментальных и аналитических методов и на системном и комплексном анализе имеющихся и полученных данных. Методы, использованные в работе: морфологический и морфометрический методы, включая гистохимические (окраска по Ван Гизон) и иммуногистохимические маркеры: Ki67, VEGF, p53, Vax, Bcl-2, FGFR1, Androgen receptor, Estrogen receptor, статистическая обработка результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Морфометрическая (ширина, диаметр канальцев, количество клеток, состояние сперматогенного эпителия) и морфофункциональная (активность процессов пролиферации и апоптоза, рецепторов гормонов, васкулоэндотелиального фактора) оценка изменений в строме и паренхиме яичек плодов от беременных с различными нарушениями маточно-плацентарного кровообращения позволяет объективно характеризовать степень повреждения органа.
2. Морфофункциональные изменения, развивающиеся в яичках плодов крыс, под влиянием смоделированной гипоксии различного генеза, имеют морфологическое сходство с изменением яичек плодов человека, умерших от гипоксии в результате нарушения маточно-плацентарного

кровообращения и характеризуются развитием дистрофических и некробиотических изменений репродуктивной сферы.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность результатов исследований обеспечена достаточным объемом и адекватным подбором клинического и экспериментального материала, использованием современных методов статистической обработки. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных морфологических и морфометрических методов исследования, адекватных поставленным задачам.

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics 24.0. При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Значимость различий определяли при помощи критерия Манна-Уитни (Z) с вычислением медианы и процентилей, а также применяли критерий Фишера.

Результаты исследований докладывались и обсуждались на следующих конференциях: федеральном конгрессе с международным участием «Сексуальное здоровье мужчины. Текущие интересы науки и здравоохранения» (Ростов на Дону, 2013); конференции с международным участием Интернет-биофотоника XI Школа для молодых ученых в рамках Saratov Fall Meeting-2018 (Саратов, 2018); XX международной научной конференции «Научный диалог: вопросы медицины» (Санкт-Петербург, 2019); международной научной конференции, посвященной 110-летию СГУ им. Н.Г. Чернышевского «Живые системы: передовые междисциплинарные технологии изучения, управления и сохранения» (Саратов, 2019); конференции с международным участием Интернет-биофотоника VII Школа для молодых ученых в рамках Saratov Fall Meeting-2019 (Саратов, 2019); XIII Всероссийской с международным участием научной конференции студентов и молодых ученых-медиков «Молодежь - практическому здравоохранению» (Иваново, 2019); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Медицинская весна 2020 (Москва, 2020); XXIII Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2020).

Внедрение в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии, лечебную работу патологоанатомических отделений Университетской клинической больницы №1 им. С.Р. Миротворцева СГМУ г. Саратова и ГАУЗ "Энгельсская городская клиническая больница №1» г. Энгельса.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам: 2 – «Прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания», 3 – «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор принимала непосредственное участие на всех этапах выполнения работы: определяла цель и задачи исследования, осваивала методы окраски, включая иммуногистохимическое исследование, проводила морфометрию, описывала результаты исследования. Диссертантом лично проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, сформулированы параметры для формирования групп, сделаны доклады и написаны статьи по полученному материалу.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе: научных статей, включенных в перечень Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки - 2 статьи, в журналах включенных международных базах Web of Science, Scopus - 3 статьи, в иных изданиях – 10 статей.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Материал изложен на 146 страницах печатного текста, содержит 32 таблицы и иллюстрирован 57 рисунками. Список литературы содержит 155 источников, из них 74 отечественных и 81 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на клиническом и экспериментальном материале. Клиническим материалом для изучения послужили 78 плодов, погибших на сроке гестации 19-40 недель, за период 2012-2020 г. В соответствии с задачами исследования весь изучаемый материал был разделен на две группы: основную и группу сравнения.

В основную группу были включены 47 плодов со сроком гестации от 19 до 40 недели. Ведущим критерием включения в основную группу наблюдения служило наличие хронической внутриутробной гипоксии плода, выявляемое при аутопсии и исследовании плаценты. У всех

плодов данной группы на основании морфологического исследования плаценты отмечали признаки хронической плацентарной недостаточности.

Группу сравнения составил 31 плод при относительно физиологически протекающей беременности, полученный в результате искусственного прерывания беременности по медицинским показаниям, или в результате преждевременной отслойки плаценты на сроке гестации от 19 до 40 недель. Критерием отсутствия хронической внутриутробной гипоксии у плодов служило отсутствие признаков хронической плацентарной недостаточности.

В каждом наблюдении изучали представленную медицинскую документацию. У всех плодов исследовалась плацента.

В качестве материала для исследования в проведенной работе использовали яички плодов, изъятые при вскрытии. При макроскопическом исследовании обращали внимание на форму гонад, проводили измерение размеров (длины, ширины и толщины), массы половых желез. Затем яички фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина.

Во время аутопсии измеряли длину плода, определяли массу тела и плаценты и рассчитывали плацентарно-плодовый коэффициент.

Для оценки влияния хронической гипоксии на течение беременности и развитие яичек у крыс было проведено экспериментальное исследование, одобренное локальным комитетом по этике (протокол №5 от 07.02.2017 г.). Экспериментальное исследование проводили на базе центра коллективного пользования ФГБОУ ВО Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

В работе были использованы 15 самок белых беспородных крыс в возрасте от 4 до 10 месяцев с массой 150-230 г. Лабораторные животные были разделены на 3 экспериментальные группы, по 5 самок в каждой.

Животные группы I подвергались гипоксической гипоксии на протяжении всей беременности (21 день). Моделирование гипоксии проводили в соответствии с методикой Н.Н. Каркищенко (2010). Животных помещали под колпак и выдерживали там до тех пор, пока визуально не отмечали симптомы гипоксии (частое прерывистое дыхание, пассивное состояние). Данный опыт проводили ежедневно до наступления родов.

Животные группы II подвергались гемической гипоксии на протяжении второй и третьей недель беременности в соответствии с методикой Л.М. Соседовой (2013). С 10-го по 19-й день беременности ежедневно подкожно вводили раствор нитрита натрия в дозе 50 мг/кг.

Животные группы III – контрольная группа, в которой особи не подвергались кислородному голоданию на протяжении всей беременности (21 день).

Отсчет срока беременности начинали с момента обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке крысы.

На 20-й день гестации в группах было проведено ультразвуковое исследование с доплерографией маточно-плодового кровотока и измерение плаценты. Обследование матки выполняли трансабдоминально с использованием ультразвуковой аппаратуры реального времени (Voluson E8,7 МГц, Thyroid). Измеряли кровоток маточной артерии и регистрировали изменения картины кровообращения матки у животных экспериментальных групп. Во время исследований рассчитывали пиковую систолическую скорость артериального кровотока (PSV), конечную диастолическую скорость (EDV), индекс резистентности (ИР) и систоло-диастолическое отношение (СДО), толщину плаценты.

Для изучения влияния хронической внутриутробной гипоксии в отдаленном периоде из каждой группы было отобрано по 5 особей мужского пола. Все особи содержались в стандартных условиях вивария до половозрелости (90 дней). При наступлении половозрелого возраста крыс-самцов выводили из эксперимента методом декапитации с использованием гильотины. Оставшиеся 55 новорожденных крысят были выведены из эксперимента методом цервикальной дислокации.

Животные всех экспериментальных групп содержались в стандартных виварных условиях.

Опыты проводили в отдельной лаборатории при постоянной температуре со стандартным уровнем освещения, исключая сторонние раздражители. Для устранения влияния сезонной циркадной зависимости эксперименты проводили в осенне-зимний период в первой половине дня.

После стандартной гистологической проводки в спиртах возрастающей концентрации материал заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 4-5 мкм готовили на роторном микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином (для обзорных исследований морфологических изменений).

Морфометрический анализ гистологических препаратов и фотографирование выполняли с помощью Микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-101 (ЛОМО, Россия).

На аутопсийном материале яичек плодов человека не менее чем в десяти полях зрения каждого случая при увеличении 246,4 проводили подсчет следующих показателей: количество канальцев, диаметр канальцев, количество сосудов в строме. При увеличении 774 подсчитывали количество клеток в канальцах, количество клеток Лейдига, измеряли высоту клеток в канальцах, площадь извитых семенных канальцев и площадь интерстициальной соединительной ткани.

В экспериментальной части работы на срезах яичек крысят не менее чем в десяти полях зрения каждого случая при увеличении 774 проводили подсчет следующих показателей: количество канальцев, количество клеток в канальцах, количество сосудов в строме, количество

клеток Лейдига, диаметр канальцев, площадь паренхимы и стромы. В тканях яичек половозрелых самцов определяли следующие признаки: диаметр канальцев, количество сперматогоний, индекс сперматогенеза, представляющего собой соотношение количества слоев сперматогенных клеток, обнаруженных в каждом извитом семенном канальце, к количеству подсчитанных канальцев.

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). Использовали следующую панель моно- и поликлональных антител: маркеры апоптоза p53 (clone PAb 240, ab26), Bax (clone 100/D5, ab692), Bcl-2 (clone 124), рецепторы к половым гормонам Androgen receptor (clone AR441, M3562) и Estrogen receptor β 1(clone PPG5/10, M7292), маркер пролиферации Ki67 (clone SP6, ab16667), ангиогенеза VEGF (clone JH121, ab28775) и фактора роста фибробластов FGFR1 (PAb, ab63601).

При окраске с иммуногистохимическими маркерами использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводилось для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий окраски и повышения объективности полученных результатов. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали следующим образом: подсчитывали процент клеток, дающих положительную экспрессию не менее чем в 30 полях зрения, далее высчитывали для каждой из исследуемых групп средний процент клеток с экспрессией. Степень выраженности экспрессии оценивали полуколичественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

Статистический анализ выполнен при помощи пакета компьютерных программ SPSS Statistics 24.0.

Нормальность распределения количественных признаков в группах была проверена при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Равенство генеральных дисперсий определяли с помощью F-критерия Фишера. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$. Формулы и методы статистического анализа использовали из руководств (Гублер Е.В., 1973, Гланц С., 1998, Гржибовский А.М., 2008). При проверке выборочных совокупностей исследуемых величин на нормальность распределения большая часть их не подчинялась закону нормального распределения. Для описания центральной тенденции использовали медиану (Me), 25 и 75 перцентили. Значимость различий между конкретными группами определяли при помощи критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований и сопоставления клинических данных было установлено, что медиана возраста рожениц в группе с развитием острой гипоксии была меньше, чем в группе с хронической гипоксией плода, за исключением одной группы с гестацией 19-22 недель, т.е. хроническая гипоксия плода развивается чаще у возрастных беременных. При сопоставлении данных роста, массы тела плодов в группах с острой и хронической гипоксией было отмечено, что плоды с хронической гипоксией отставали в росте и имели меньшую массу.

При сопоставлении массы плаценты было выявлено, что в группе плодов с острой гипоксией с увеличением срока гестации масса плаценты постепенно увеличивалась. При хронической гипоксии масса плаценты практически не менялась и ее рост отмечали только в период 30-40 недель.

Анализ макроскопического исследования яичек плодов показал, что масса, линейные размеры и объем гонад в группе плодов с острой гипоксией на всех сроках гестации превышали таковые параметры в группе плодов с хронической гипоксией.

При обзорной микроскопии яичек плодов 19-22 недель гестации в группе острой гипоксии наблюдали семенные каналцы с четкой базальной мембраной.

Таблица 1 - Морфометрическая характеристика яичек плодов в группах с острой и хронической гипоксией в 19-22 недели гестации

Показатель	19-22 недели гестации		p
	Острая Гипоксия Me [25;75]	Хроническая гипоксия Me [25;75]	
Количество каналцев в поле зрения	18 [14;19]	15 [13;18]	0,0001
Количество клеток в каналцах	37 [33;44]	37 [33;40]	0,057
Количество сосудов	5 [3;8]	6 [3;8]	0,634
Количество клеток Лейдига	7 [5;11]	9 [5;10]	0,115
Диаметр каналцев, мкм	0,052 [0,050;0,058]	0,048 [0,040;0,052]	0,0001
Высота клеток в каналцах, мкм	0,008 [0,007;0,009]	0,007 [0,006;0,008]	0,013
Площадь каналцев мкм ²	0,0110 [0,0080;0,0123]	0,0089 [0,0073;0,0101]	0,0001
Площадь стромы, мкм ²	0,0100 [0,0087;0,0130]	0,0121 [0,0110;0,0137]	0,0001

В группе плодов с хронической гипоксией в 19-22 недели каналцы имели нечеткие контуры, плохо визуализировались. Клетки в каналцах располагались хаотично, просвета в каналцах не было, встречались крупные клетки с вакуолизированной цитоплазмой (таблица 1).

В период 23-25 недель гестации в группе плодов с острой гипоксией отмечалось преобладание каналцевой ткани. Клетки сперматогенного эпителия находились ближе к базальной мембране, формируя просвет в извитых семенных каналцах.

В этот же период в группе плодов с хронической гипоксией был хорошо выражен стромальный компонент. В интерстиции определялось большое количество клеток Лейдига, располагавшихся полями (таблица 2).

Таблица 2 - Морфометрическая характеристика яичек плодов яичек плодов в группах с острой и хронической гипоксией в 23-25 недель гестации

Показатель	23-25 недель гестации		p
	Острая гипоксия Me [25;75]	Хроническая гипоксия Me [25;75]	
Количество каналцев в поле зрения	16 [13;21]	15 [14;19]	0,017
Количество клеток в каналцах	34 [26;46]	35 [29;47]	0,824
Количество сосудов	7 [3;14]	17 [7;22]	0,0001
Количество клеток Лейдига	6 [5;8]	11 [9;14]	0,0001
Диаметр каналцев, мкм	0,057 [0,050;0,061]	0,053 [0,048;0,063]	0,007
Высота клеток в каналцах, мкм	0,008 [0,007;0,009]	0,007 [0,006;0,007]	0,001
Площадь каналцев мкм ²	0,0119 [0,0098;0,0124]	0,009 [0,0069;0,0105]	0,0001
Площадь стромы, мкм ²	0,0091 [0,0086;0,0112]	0,0120 [0,0105;0,0141]	0,0001

В сроки гестации 26-29 недель в группе плодов с острой гипоксией каналцы содержали большое количество первичных гоноцитов, сперматогоний и незрелых поддерживающих клеток, плотно лежали друг к другу. В части каналцев определялся просвет, клетки располагались упорядоченно. Канальцы формировали дольки, количество клеток Лейдига, по сравнению с предыдущими периодами, уменьшалось.

В 26-29 недель гестации в группе плодов с хронической гипоксией оставался хорошо выраженным стромальный компонент. В строме располагались мелкие полнокровные сосуды и большое количество клеток Лейдига, иногда наблюдался отек. В некоторых каналцах

появлялся просвет, в остальных – клетки располагались хаотично. Базальная мембрана в части канальцев плохо визуализировалась, отмечалась дистрофия эпителия (таблица 3).

Таблица 3 - Морфометрическая характеристика яичек плодов в группах с острой и хронической гипоксией в 26-29 недель гестации

Показатель	26-29 недель гестации		p
	Острая Гипоксия Me [25;75]	Хроническая гипоксия Me [25;75]	
Количество канальцев в поле зрения	18 [16;19]	17 [15;20]	0,001
Показатель	Острая гипоксия Me [25;75]	Хроническая гипоксия Me [25;75]	p
Количество клеток в канальцах	38 [34;46]	26 [23;33]	0,0001
Количество сосудов	7 [3;11]	11[7;14]	0,0001
Количество клеток Лейдига	5 [5;7]	12 [10;13]	0,0001
Диаметр канальцев, мкм	0,062 [0,055;0,068]	0,055 [0,050;0,060]	0,0001
Высота клеток в канальцах, мкм	0,007 [0,006;0,008]	0,008 [0,007;0,008]	0,0001
Площадь канальцев мкм ²	0,0127 [0,0106;0,0130]	0,0073 [0,0059;0,0085]	0,0001
Площадь стромы, мкм ²	0,0083 [0,0080;0,0104]	0,0137 [0,0125;0,0152]	0,0001

В сроки 30-40 недель гестации при хронической гипоксии в яичках продолжала доминировать межканальцевая соединительная ткань. Отмечалась атрофия канальцев (таблица 4).

Таким образом, в исследовании яичек плодов с острой гипоксией с увеличением срока гестации постепенно происходило увеличение таких показателей, как количество канальцев, количество клеток в них, диаметр канальцев и площадь паренхимы, что отражалось и на паренхиматозно-стромальном индексе. Количество клеток Лейдига постепенно снижалось, что совпадало с данными S. Wahengbam, S. A. Singh, N. Damayanti (2011).

В группе плодов с хронической гипоксией количество канальцев практически не менялось, количество клеток в канальцах уменьшалось, диаметр канальцев и площадь паренхимы на всех сроках гестации были ниже, чем в группе плодов с острой гипоксией. Паренхиматозно-стромальный индекс практически на всех сроках гестации был ниже, чем в группе плодов с острой гипоксией. Количество клеток Лейдига нарастало до 29 недели, затем наблюдалось их резкое уменьшение.

Таблица 4 - Морфометрическая характеристика яичек плодов в группах с острой и хронической гипоксией в 30-40 недель гестации

Показатель	30-40 недель гестации		p
	Острая Гипоксия Me [25;75]	Хроническая гипоксия Me [25;75]	
Количество канальцев в поле зрения	19 [17;22]	15 [13;16]	0,0001
Количество клеток в канальцах	46 [45;47]	33 [31;37]	0,0001
Количество сосудов	10 [9;11]	22 [15;27]	0,0001
Количество клеток Лейдига	4 [4;5]	4 [2;7]	0,109
Диаметр канальцев, мкм	0,068 [0,067;0,070]	0,064 [0,055;0,068]	0,0001
Высота клеток в канальцах, мкм	0,008 [0,008;0,008]	0,007 [0,007;0,008]	0,0001
Площадь канальцев мкм ²	0,0137 [0,0135;0,0138]	0,0092 [0,0083;0,0110]	0,001
Площадь стромы, мкм ²	0,0076 [0,0075;0,0077]	0,0118 [0,0100;0,0126]	0,0001

Данные иммуногистохимического исследования в группах плодов с острой и хронической гипоксией показали, что в группе плодов с острой гипоксией и относительно нормальным течением беременности пролиферативные процессы развиваются во все сроки гестации и самые высокие показатели пролиферации регистрируются в 26-29 недель. Медиана индекса пролиферации в этот срок составила 32%, что в 2,6 раза больше, чем в предыдущие сроки наблюдения.

У плодов, которые внутриутробно весь период беременности страдали от гипоксии, с 19 до 25 недель гестации пролиферативные процессы наблюдались лишь в единичных клетках. При сроке беременности 26-29 недель мы видели самые высокие показатели индекса пролиферации, но он все-таки был меньше, чем у плодов в группе с острой гипоксией. В сроки 30 – 40 недель гестации отмечалось снижение активности пролиферативных процессов (рисунок 1 А).

Некоторые авторы отмечают, что в фетальном семеннике человека Bcl-2 может защищать клетки от апоптоза во время их пролиферации и созревания, поскольку данный фактор является ингибитором апоптоза и отвечает за выживаемость клеток [Ketola I., Toppari J., Vaskivuo T., Herva R., 2003].

В нашем исследовании в группе плодов с хронической гипоксией максимальная экспрессия данного маркера наблюдалась в период 19-22 недели (рисунок 1Б). Можно предположить, что этот период развития компенсаторных процессов на действие патогенного фактора, в данном случае – гипоксии.

По литературным данным [Boukari K., Ciampi M.L., Guiochon-Mantel A., 2007], эстрогеновый рецептор экспрессируется в ткани яичка в клетках Сертоли, половых клетках и клетках Лейдига и имеет окно экспрессии с 13 по 22-24 недели гестации.

В нашем исследовании в группе плодов с хронической гипоксией мы наблюдали выраженную экспрессию эстрогенового рецептора во все сроки гестации, что указывает на выраженную ответную реакцию на повреждающий фактор (рисунок 1В).

При анализе данных иммуногистохимического исследования экспрессии андрогенового рецептора в группе плодов с острой и хронической гипоксией в периоды 19-29 недель мы отмечали постепенное снижение экспрессии андрогенового рецептора, отличие заключалось и в степени выраженности экспрессии данного маркера в ткани яичек плодов (рисунок 1Г).

При анализе наших данных по экспрессии васкулоэндотелиального фактора VEGF в группе плодов с острой гипоксией с увеличением срока гестации количество клеток и степень выраженности экспрессии VEGF уменьшалось, при хронической гипоксии во все сроки гестации экспрессия VEGF в канальцах была сильновыраженной (рисунок 1Д). Это совпадает с данными тех авторов, которые отмечают, что гипоксия стимулирует экспрессию VEGF [Tian R., Yang S., Zhu Y., Zou S., 2015]. Отечественными исследователями высказано мнение о возможной роли VEGF в регуляции мужской фертильности [Кульченко Н.Г., Демяшкин Г.А., 2016].

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

При УЗИ исследовании плацента в контрольной группе выглядела однородной. Она имела гомогенный вид и одинаковую плотность. В опытных группах отмечалась неоднородность ее структуры, появлялись эконегативные участки. При сравнении данных ультразвукового исследования с доплерографией экспериментальных групп наблюдались все признаки плацентарной недостаточности в опытных группах, данные различия были статистически достоверны ($p < 0,05$).

При оценке биологических показателей крыс экспериментальных и контрольной групп по массе, полу и количеству новорожденных крысят было выявлено, что количество новорожденных в контрольной группе выше, количество особей мужского пола также выше, чем в опытных.

При обзорной световой микроскопии тканей яичек контрольной группы извитые семенные канальцы имели овальную и округлую форму, плотно прилегали друг к другу. Между канальцами располагалась нежно-волокнистая соединительная ткань.

При микроскопии тканей яичек опытной группы (гипоксическая гипоксия) отдельные клетки сперматогенного эпителия были вакуолизированы. Отмечалась разреженность канальцевого аппарата за счет фиброза и перитубулярного отека. При микроскопии тканей яичек опытной группы (гемическая гипоксия) канальцы были уменьшены, отмечался выраженный отек стромы, базальная мембрана отдельных канальцев была фрагментирована, нечеткая.

При иммуногистохимическом исследовании тканей яичек новорожденных крысят в контрольной группе отмечалась выраженная экспрессия маркера пролиферации Ki67, слабая реакция маркеров апоптоза Bax, p53 и умеренно выраженная экспрессия фактора роста фибробластов FGF. В опытных группах отмечалась слабая экспрессия маркера пролиферации, умеренная экспрессия маркеров апоптоза, экспрессия фактора роста фибробластов не наблюдалась или была слабовыраженной, что согласуется с данными других авторов (Reyes, J.G., 2012).

Для изучения влияния хронической внутриутробной гипоксии в отдаленном периоде из каждой группы (I группа – крысы, перенесшие в антенатальном периоде гипоксическую гипоксию, II группа – крысы, перенесшие в антенатальном периоде гемическую гипоксию, III группа – контрольная) были отобраны 15 крысят (по 5 крысят из каждой группы). Все крысы содержались в стандартных условиях вивария до половозрелости (90 дней).

При оценке биологических показателей половозрелых самцов было отмечено, что масса крыс в группе крыс с гемической гипоксией была ниже, чем в контрольной. Однако абсолютная масса яичек во всех экспериментальных группах была практически одинаковой.

При обзорной микроскопии ткани яичек половозрелых самцов в контрольной группе семенные канальцы были округлой, овальной и полигональной формы. В просвете канальцев на базальной мембране располагались sustentocytes и клетки сперматогенного ряда на различных стадиях дифференцировки.

В опытных группах отмечали очаги деструкции базальной мембраны, отек, дистрофические изменения сперматогенного эпителия, некоторые канальцы имели неправильную форму.

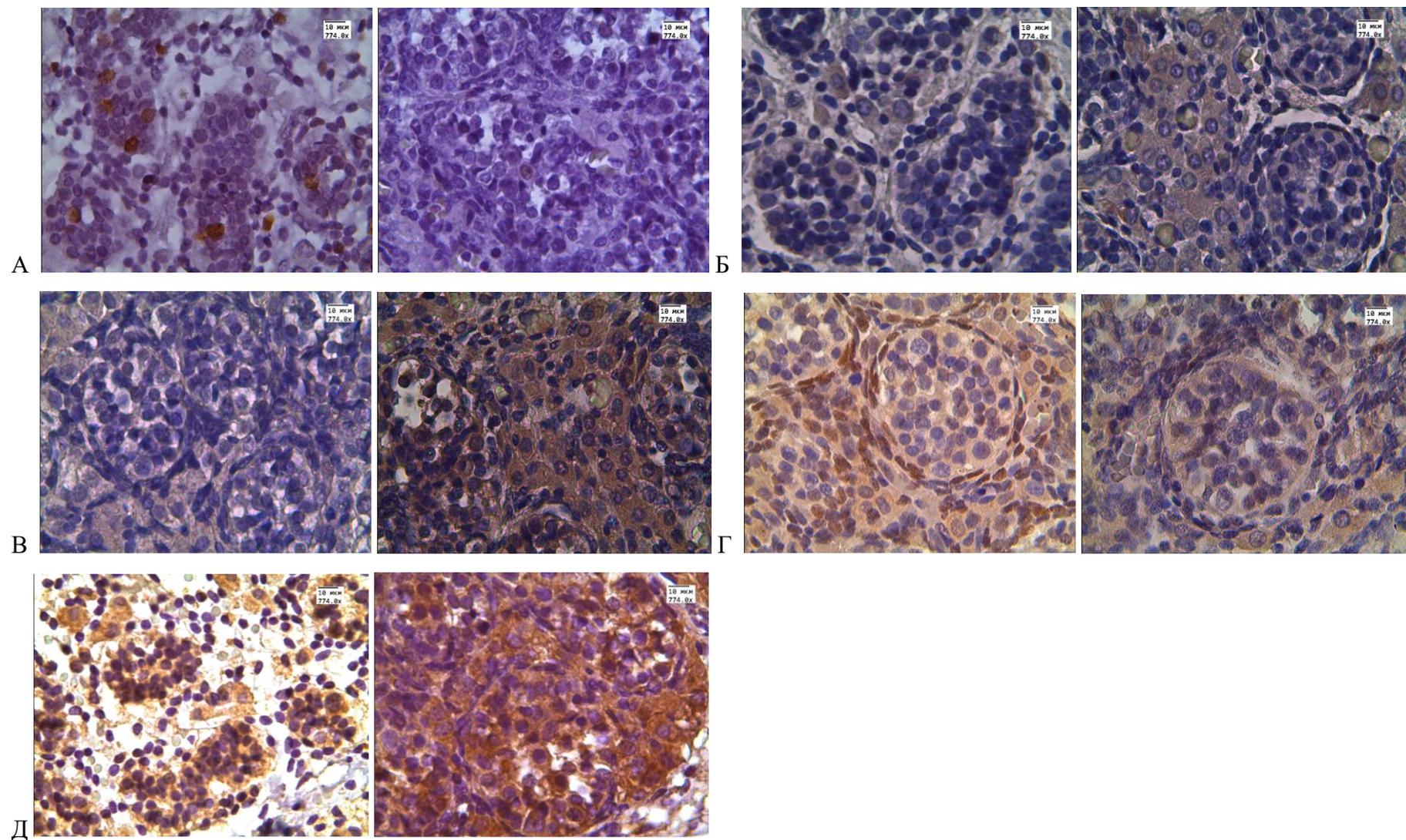


Рисунок 1. Экспрессия ИГХ маркеров в группах плодов с острой (слева) и хронической (справа) гипоксией на разных сроках гестации.
 А – Ki 67 при сроке 19-22 недель; Б – Vcl 2 при сроке 19-22 недель; В – ER при сроке 23-25 недель; Г – AR при сроке 19-22 недели;
 Д – VEGF при сроке 26-29 недель. Ув.774.

При иммуногистохимическом исследовании тканей яичек половозрелых крыс в контрольной группе отмечалась выраженная экспрессия маркера пролиферации Ki67, слабая экспрессия маркера апоптоза Вах и умеренно выраженная экспрессия фактора роста фибробластов.

В яичках крыс опытных групп экспрессия маркера пролиферации уменьшалась, в группе гемической гипоксии клетки отдельных канальцев не имели экспрессии. Экспрессия маркера апоптоза Вах в опытных группах была различной. Так, в группе гипоксической гипоксии экспрессия маркера апоптоза Вах была слабо и умеренно выраженной в клетках отдельных канальцев. В группе крыс с гемической гипоксией экспрессия была ядерной, выраженной и наблюдалась во всех клетках сперматогенного эпителия. Экспрессия фактора роста фибробластов была слабовыраженной в обеих группах.

Зарегистрированные изменения размеров извитых семенных канальцев указывают на угнетение процессов сперматогенеза, что находит свое отражение и в литературных данных [Саяпина И.Ю., Целуйко С.С., 2013].

Исходя из всего вышеизложенного, можно заключить, что у животных с хроническим кислородным голоданием различного генеза имеет место угнетение процесса сперматогенеза, что достоверно подтверждается как общепринятыми морфометрическими методами, так и специфическими иммуногистохимическими методами исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На клиническом аутопсийном материале в результате проведенного исследования было установлено, что в условиях хронической гипоксии происходит негармоничное развитие всех структурных компонентов яичка, которое выражается в уменьшении диаметра канальцев, количества клеток в канальцах, дистрофии сперматогенного эпителия, разрастании интерстиция.

Было установлено, что в условиях хронической гипоксии снижается пролиферативная активность, усиливается апоптоз зародышевых клеток, наблюдается повышение экспрессии васкулоэндотелиального фактора. Изменение гормональной активности в яичках плодов проявляется в виде снижения экспрессии андрогенового рецептора и усиления экспрессии эстрогенового рецептора.

На различных экспериментальных моделях внутриутробной гипоксии были установлены морфофункциональные нарушения становления репродуктивной системы у потомства, сходные с аутопсийным материалом. У новорожденных крысят при моделировании внутриутробной гипоксии (гемической и гипоксической) наблюдалась дистрофия сперматогенного эпителия,

уменьшение диаметра канальцев, нарастал перитубулярный отек, снижалась пролиферативная активность эпителия канальцев и экспрессия фактора роста фибробластов, усиливалась апоптотическая активность.

На экспериментальном материале было показано, что хроническая внутриутробная гипоксия оказывает дестабилизирующее влияние на ткань яичек в отдаленном периоде. Так, у половозрелых самцов опытных групп в яичках уменьшался диаметр канальцев, снижался индекс сперматогенеза, усиливалась апоптотическая активность зародышевых клеток и ослабевала пролиферативная активность и экспрессия фактора роста фибробластов.

ВЫВОДЫ

1. Морфофункциональные изменения в ткани яичек у плодов при патологическом течении беременности у женщин с нарушением маточно-плацентарного кровообращения, хронической гипоксией плода, выражаются в разрастании стромы и атрофии паренхимы органа, что проявляется уменьшением диаметра канальцев и количества клеток в них, дистрофией сперматогенного эпителия, снижением пролиферативного потенциала и усилением апоптотической активности. Установлена зависимость между сроком гестации и паренхиматозно - стромальным индексом в тканях яичек плода, который уменьшается при хронической внутриутробной гипоксии.
2. Хроническая гипоксия и развивающиеся морфофункциональные изменения в яичках у плода человека сопровождаются развитием гормональной дисфункции, о чем свидетельствует снижение экспрессии андрогенового рецептора и усиление экспрессии эстрогенового рецептора при усилении экспрессии васкулоэндотелиального фактора, что в дальнейшем может привести к патологии репродуктивной функции в половозрелом возрасте.
3. Морфологические изменения в яичках у новорожденных крысят, развивающиеся в условиях моделирования внутриутробной гипоксии у крыс, заключаются в формировании дистрофических изменений в клетках сперматогенного эпителия, перитубулярном отеке, уменьшении диаметра канальцев, снижении пролиферативной активности и функции фактора роста фибробластов на фоне усиления апоптотической активности сперматогенного эпителия.
4. Морфологические изменения в яичках, развившиеся в условиях моделирования внутриутробной фактора роста фибробластов на фоне усиления апоптотической активности сперматогенного эпителия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты дополняют данные о морфогенезе яичек в антенатальном периоде в условиях хронической внутриутробной гипоксии, и могут быть использованы в

научных исследованиях и в учебном процессе при изложении вопросов влияния различных экзо- и эндогенных факторов на репродуктивную систему.

2. Полученные органомерметрические параметры яичек плодов, от матерей при относительно нормальном течении беременности являются показателем для сравнения размеров, массы и объема гонад при различных сроках гестации у плодов в патологоанатомической и судебно-медицинской практике.

3. Предложенный для объективной оценки морфофункциональных изменений ткани яичек перечень информативных показателей (диаметр канальцев, количество клеток в канальцах, площадь паренхимы и стромы, индекс апоптоза и пролиферативный потенциал, уровень экспрессии половых гормонов и ростовых факторов) повышает информативность морфологического исследования плодов и мертворожденных.

4. Полученные данные могут быть использованы клиницистами для оптимизации объема диагностических и лечебно-профилактических мероприятий по снижению риска формирования бесплодия у плодов мужского пола при ведении беременных с нарушениями маточно-плацентарного кровообращения

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние угрозы прерывания беременности на формирование яичек плода / М.Л. Чехонацкая, Е.А. Колесникова, Г.Н. Маслякова, **Т.В. Палатова**, Л.К. Василевич // Сборник трудов федерального конгресса «Сексуальное здоровье мужчины. Текущие интересы науки и здравоохранения» с международным участием. Ростов-на-Дону: Изд-во РА «Экспо-Медиа», 2013. — С. 107-108.

2. Современное представление о развитии и патологии яичек плода / Г.Н. Маслякова, **Т.В. Палатова**, А.А. Серкова // **Саратовский научно-медицинский журнал**. — 2015. — Т. 11 № 4. — С. 511-514 [ВАК].

3. Патологические факторы в становлении репродуктивной системы плода (обзор литературы) / Г.Н. Маслякова, **Т.В. Палатова**, М.Л. Чехонацкая. // Бюллетень медицинских интернет-конференций. — 2016. — Т. 6 № 2 — С. 259-261.

4. Морфологические особенности яичек плода при хронической внутриутробной гипоксии на разных сроках гестации / **Т.В. Палатова**, А.В. Медведева, Е.С. Воронина, Е.Н. Цмокалюк, С.А. Воронцова, С.С. Пахомий, Г.Н. Маслякова // Бюллетень медицинских интернет-конференций. — 2017. — Т. 6 № 2 — С. 560-562.

5. Влияние хронической внутриутробной гипоксии на развитие яичек новорожденных (экспериментальное исследование) / Г.Н. Маслякова, **Т.В. Палатова**, А.Б. Бучарская, А.В.

Медведева, Е.С. Воронина // **Современные проблемы науки и образования.** — 2017. № 6 — С. 27 [ВАК].

6. Influence of chronic intrauterine hypoxia on development of testicles of newborns / **T.V. Palatova**, A.B. Bucharskaya, A.V. Medvedeva, E.S. Voronina, G.N. Maslyakova // **Russian Open Medical Journal.** — 2018. — Т. 7 № 2 — С. 1-5 [Web of Science, Scopus].

7. Морфологические особенности яичек плода при хронической внутриутробной гипоксии на разных сроках гестации / **Т.В. Палатова**, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, А.В. Медведева, Е.С. Воронина // **Архив патологии.** — 2018. — Т. 80 № 4 — С. 21-26. [Web of Science, Scopus].

8. Functional and morphological changes in the mother-placenta-fetus system during chronic hypoxia (experimental study) / **T.V. Palatova**, G. N. Maslyakova, M.L. Chekhonatskaya, A. B. Bucharskaya, E.A. Genina, A.N. Bashkatov // Proc. SPIE 11065, Saratov Fall Meeting 2018: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine, 110651W (3 June 2019); doi: 10.1117/12.2523634.

9. Роль антенатальной гипоксии в развитии яичек плода (экспериментальное исследование) / **Т.В. Палатова**, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская // Молодежь - практическому здравоохранению. Саратов: Изд-во СГМУ, 2019. — С. 312-315.

10. Влияние хронической внутриутробной гипоксии на репродуктивную систему плода / **Т.В. Палатова**, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, А.В. Медведева, Е.С. Воронина, С.С. Пахомий. // Живые системы – 2019: сборник научных статей. Саратов: Изд-во Амирит, 2019. — С.38-40.

11. Functional and morphological changes in the testicular tissue of rat newborns during chronic hypoxia: experimental study / **T.V. Palatova**, G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya, E. A. Genina, A. N. Bashkatov // Proc. SPIE 11457, Saratov Fall Meeting 2019: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine, 114570N (9 April 2020); doi: 10.1117/12.2563415.

12. Влияние хронической внутриутробной гипоксии на репродуктивную систему плода (экспериментальное исследование) / **Т.В. Палатова**, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, Е.С. Воронина, А.В. Медведева, С.С. Пахомий // Научный диалог: Вопросы медицины. Сборник научных трудов, по материалам XX международной научно-практической конференции. — СПб:Изд. ЦНК МОАН, 2019. — С.9-13.

13. Влияние внутриутробной гипоксии на репродуктивную функцию яичек / **Т.В. Палатова**, Г.Н. Маслякова // Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей, посвященная 25-летию медицинского факультета СПбГУ: Материалы научной конференции Том. XXIII.- СПб: Издательский дом «Сциентиа», 2020. — С.15-16.

14. Влияние внутриутробной гемической гипоксии на репродуктивную функцию яичек / В.Д. Морозова, Р.Е. Черобаев, **Т.В. Палатова** // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская весна – 2020», – М.: —Издательство ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 2020. — С.423-424.

15. The effect of intrauterine hypoxia on testicular reproductive function / **T.V. Palatova**, A.B. Bucharskaya, A.V. Medvedeva, E.S. Voronina, S.S. Pahomy, G.N. Maslyakova // **Russian Open Medical Journal**. — 2021. — Т. 10 № 2 — С. 1-6. [Web of Science, Scopus].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AR – андрогеновый рецептор

EDV – конечная диастолическая скорость

ER – эстрогеновый рецептор

FGF – фактор роста фибробластов

HIF – гипоксия-индуцируемый фактор

PSV – пиковая систолическая скорость артериального кровотока

SR γ – ген, кодирующий фактор развития семенников

SOX9 – ген, играющий роль в детерминации и дифференцировке пола

VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста

ВПП – врожденный порок развития

ИЭ – интерстициальные эндокриноциты

ППК – плацентарно-плодовый коэффициент

ПСИ – паренхиматозно-стромальный индекс

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение