

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
В.И. РАЗУМОВСКОГО» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



Палатова Татьяна Васильевна

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

14.03.02 – Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Маслякова Галина Никифоровна

Саратов - 2021

## Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Проблема мужского бесплодия: частота, причины, морфологические проявления (обзор литературы).....	12
1.1. Эмбриогенез яичек плода.....	14
1.2. Влияние гипоксии на развитие плода в антенатальном периоде.....	17
1.3. Плацента и плацентарная недостаточность.....	21
1.4. Морфология яичек плодов и новорожденных при влиянии повреждающих факторов.....	24
1.5. Экспериментальные исследования влияния гипоксии на развитие репродуктивной системы.....	28
Глава 2. Материалы и методы. Дизайн эксперимента.....	31
2.1. Общая характеристика исследуемых объектов.....	31
2.2. Методы исследования.....	35
2.2.1. Морфологические и морфометрические методы исследования семенников.....	35
2.2.2. Иммуногистохимическое исследование.....	36
2.2.3. Статистические методы исследования и обработки данных.....	38
Глава 3. Морфологические изменения у плодов и в плаценте при нарушении маточно-плацентарного кровообращения во время беременности.....	39
3.1. Морфологическое исследование плодов и плаценты от матерей с патологией беременности, приводящей к острым нарушениям маточно-плацентарного кровообращения.....	40
3.2. Морфологический анализ изменений у плодов и в плаценте при патологии беременности матери, развившейся на фоне хронических нарушений маточно-плацентарного кровообращения.....	43
Глава 4. Морфометрическое исследование яичек плодов человека на разных сроках гестации, погибших от острой асфиксии.....	50

4.1. Макроскопическая характеристика изменений яичек плодов, погибших от острой асфиксии .....	51
4.2. Гистологические и морфометрические изменения в тканях яичек плодов, погибших от острой асфиксии .....	53
4.3. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии маркеров пролиферации, апоптоза, фактора роста эндотелия сосудов и рецепторов эстрогена и андрогена в яичках плодов при острой гипоксии .....	59
Глава 5. Морфологические изменения яичек плодов на фоне хронической внутриутробной гипоксии .....	65
5.1. Макроскопическая характеристика яичек .....	65
5.2. Морфология яичек плодов при хронической гипоксии .....	67
5.3. Иммуногистохимические особенности экспрессии маркеров пролиферации, апоптоза, фактора роста эндотелия сосудов и рецепторов эстрогена и андрогена в яичках плода на фоне хронической гипоксии .....	73
Глава 6. Морфометрическая и иммуногистохимическая характеристика изменений потомства крыс при экспериментальном моделировании состояния внутриутробной гипоксии плода .....	81
6.1. Результаты ультразвукового исследования плаценты и доплерографии сосудов матки беременных крыс .....	81
6.2. Морфологическая и морфометрическая характеристика тканей яичек новорожденных крысят .....	83
6.3. Иммуногистохимическое исследование тканей яичек новорожденных крысят .....	87
6.4. Морфологическая характеристика яичек половозрелых самцов .....	91
6.5. Иммуногистохимическое исследование тканей яичек половозрелых крыс ....	95
Глава 7. Сравнительный статистический анализ и обсуждение полученных результатов.....	100
7.1. Секционный раздел работы.....	100

7.2. Экспериментальный раздел работы .....	118
Заключение .....	124
Выводы .....	125
Практические рекомендации.....	126
Список сокращений и условных обозначений.....	127
Список литературы .....	128

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Бесплодие в браке – одна из наиболее важных и сложных медицинских, социально-демографических и экономических проблем. Сегодня брак считается бесплодным, если беременность не наступает при регулярной (не реже 4 раз в месяц) половой жизни в течение года без использования контрацепции (Еркенова С.В., 2017). Частота бесплодных браков в различных странах мира колеблется от 8 до 29 %. Так, в Европе доля таких браков составляет около 10%, в США – 15%, в Канаде – 17 %. В России бесплодными являются от 8 до 17,5 % супружеских пар (Гончарова Н.Н. и др., 2012; Тавокина Л.В., 2014). Как правило, самые высокие показатели бесплодия наблюдаются в странах с высоким уровнем рождаемости - случай, названный в литературе «бесплодие среди множества» (Balen, F.V., 2001; Kumar N., Singh A.K., 2015).

Изучение бездетных супружеских пар в последнее время показало, что причиной бесплодия в 40-60 % становится мужской фактор, поэтому ему должно быть уделено такое же пристальное внимание, как и женскому бесплодию (Данилова Т.И., Тихомирова В.Ю. и др., 2006; Тавокина Л.В., 2014).

Как известно, различные заболевания женщин, а также патология беременности и родов, отрицательно сказываются на течении внутриутробного периода, вызывая нередко глубокие нарушения развития плода, функциональные и структурные изменения его отдельных органов и систем.

В литературе достаточно широко представлены исследования, свидетельствующие об изменениях в половых железах плодов и новорожденных женского пола, родившихся у больных матерей (Галкина Ю.В., 2007; Медведева А.В., 2007; Зенкина В.Г., 2014; Rani V.U., Devi V.S, 2011).

Что касается гонад плодов и новорожденных мужского пола, родившихся у женщин с нарушением в течение беременности, то число исследований по данному вопросу весьма ограничено.

Однако именно этому периоду следует придавать особое значение, так как повреждение репродуктивной системы в период гестации может быть необратимым и привести в дальнейшем к нарушению как инкреторной, так и сперматогенной функций яичек (Артифексова М.С., Артифексов С.Б., 2011).

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).

### **Степень разработанности темы исследования**

В литературе имеется небольшое количество работ, изучавших морфофункциональные особенности репродуктивной системы плода под влиянием гипоксии. Данные исследования 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.

Выяснение структурно-функциональных основ нарушения развития мужских половых желез (яичек) на пренатальном этапе, направленное на раскрытие механизмов формирования патологии полового развития плода будет способствовать уточнению причин возникновения мужского бесплодия.

### **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**

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**

Программа исследования состоит из клинических, экспериментальных и статистических методов. При выполнении работы были использованы морфологический, морфометрический методы исследования, включая гистохимические (окраска по Ван Гизон) и иммуногистохимические маркеры: Ki67, VEGF, p53, Вах, Bcl-2, FGFR1, Androgen receptor, Estrogen receptor, а также статистическая обработка результатов.

### **Основные 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.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации рассмотрены и обсуждены на 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 результатов исследования**

Результаты диссертации используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И.Разумовского. Полученные данные внедрены в лечебную работу патологоанатомических отделений Университетской клинической больницы №1 им. С.Р. Миротворцева СГМУ г. Саратова и ГАУЗ "Энгельсская городская клиническая больница №1» г. Энгельса.

### **Публикации**

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

### **Объём и структура диссертации**

Работа изложена на 146 страницах машинописного текста. В диссертации выделены основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственного исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, список литературы.

Работа иллюстрирована 57 рисунками и 32 таблицами. Список литературы содержит 155 источников, из них 74 отечественных и 81 иностранный.

## **Глава 1. Проблема мужского бесплодия: частота, причины, морфологические проявления (обзор литературы)**

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 (Кондратьева Т.А., 2009; Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al., 2017).

Некоторые авторы данный факт связывают с нарушениями, возникшими в процессе внутриутробного развития (Володин Н.Н., 2009; Буштырева И.О., 2005). Значимое место проблеме фертильности уделено в программе ВОЗ «Сексуальное и репродуктивное здоровье», где освещаются вопросы динамики показателей рождаемости и формирования условий для воспроизводства здорового потомства (Радченко О.Р., 2011).

Происхождение мужского бесплодия различно (Жебентяев А.А., 2008). Мужская фертильность может быть снижена в результате формирования врожденных или приобретенных аномалий половой системы, злокачественных новообразований, инфекций мочеполового тракта, повышения температуры мошонки (например, вследствие варикоцеле), эндокринных нарушений, иммунологических факторов и др.

В 30-40 % случаев этиология мужского бесплодия остается не выясненной (Sadeghi M. R., 2015; Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al., 2017). У данных пациентов не отягощен анамнез, нет изменений при объективном осмотре и стандартном лабораторном обследовании. Однако в спермограмме наблюдаются отклонения от нормы в виде снижения количества сперматозоидов, снижения их активности, изменение формы сперматозоидов. Часто наблюдается сочетание этих нарушений - олигоастенотератозооспермия. Большинство бесплодных

мужчин прибегают к какой-либо вспомогательной репродуктивной технике, однако, несмотря на это, они также несут потенциальный риск передачи генетических или эпигенетических aberrаций потомкам (Wu W., Shen O., 2010).

Некоторые авторы причины мужского бесплодия связывают с гормональными нарушениями, возникающими вследствие загрязнения окружающей среды, накоплением свободных радикалов кислорода, генетическими отклонениями (Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al., 2017).

Большинство отечественных и зарубежных авторов видят причины 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).

Правдивость термина «идиопатическое бесплодие» оспаривается многими клиницистами и исследователями; они подчеркивают, что окончательная постановка диагноза бесплодной паре во многом зависит от количества, качества и характера применяемых диагностических тестов (Johnson L.N., Sasson I.E., 2013; Gelbaya T.A., Potdar N., 2014).

Таким образом, исследования показывают, что бесплодие «неясного генеза» - это многофакторное гетерогенное заболевание (Tarín J.J., García-Pérez M.A., 2015), которое требует дальнейшей разработки теоретических аспектов в целях расширения возможностей терапевтических воздействий (Гамидов С. И., 2019; Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al., 2017).

## 1.1. Эмбриогенез яичек плода

Эндокринная система плода, в том числе тестикулярная, формируется внутриутробно с 8-9 недели гестационного возраста и, следовательно, подвержена воздействию различных повреждающих факторов. Морфогенез эндокринной системы плода предопределяет адаптационные реакции организма в постнатальной жизни, а его особенности являются основой патогенеза эндокринных заболеваний взрослого человека, в том числе - мужского бесплодия.

Половая система человека в течение раннего периода эмбриогенеза проходит индифферентные стадии развития независимо от генетического пола индивидуума. Первичные зародышевые клетки, являясь полипотентными, способны к дифференцировке в любом направлении (Герасимович Г.И., 2010).

Эмбриогенез половой системы – это сложный процесс, который требует активной работы различных генетических и гормональных факторов. К таким факторам относятся продукты Y-хромосомы и гормоны яичек самого эмбриона.

В период эмбриогенеза формирование пола происходит в три основных этапа (Дедов И.И., 2002).

Первый этап является единым для эмбрионов обоего пола (1-7 недели эмбриогенеза). В этот период происходит закладка недифференцированных первичных гонад. Сначала происходит дифференцировка фетальных надпочечников и первичной гонады от производного мезодермы. Данные образования утолщением целомического эпителия над мезонефросом (первичной почкой). Далее в первичную гонаду премещаются гоноциты, или первичные половые клетки (ППК). Гистохимически эти клетки можно определить с помощью ШИК-реакции. Иммуногистохимически они экспрессируют маркеры плюрипотентности - OCT4 и C-KIT (Gaskell T.L., 2005).

Этот процесс контролируется большим количеством генов аутосомного происхождения.

К 4 неделе у плода любого пола имеются две пары протоков: вольфовы и мюллеровы. Вольфовы протоки впоследствии развиваются во внутренние половые органы мальчика, мюллеровы – внутренние гениталии девочки.

Наружные половые органы формируются из общего генитального бугорка, складок и валиков уретры.

В течение второго этапа происходит дифференцировка яичка или яичника из первичной гонады. Данный процесс захватывает 7-10 недели эмбриогенеза и находится под контролем генов полового происхождения. Экспрессия генов *SR $\gamma$*  и *SOX9*, которые содержатся в Y-хромосоме, приводит к трансформации сустентоцитов (клеток Сертоли). Данные клеточные популяции, формируя каналцы, ограничивают первичные половые клетки. Одновременно с этим процессом происходит дифференцировка интерстициальных эндокриноцитов – клеток Лейдига. Поскольку данные клетки в своей ультраструктуре содержат рецепторы к половым гормонам, лютеинизирующему гормону (ЛГ) и хорионическому гонадотропину (ХГЧ), к 10 неделе происходит повышение секреции тестостерона (Кожухарь В.Г., 2012; Райгородская Н.Ю., 2014).

На третьем этапе (9-14 неделя) полового развития происходит формирование внутренних и наружных половых органов плода. Здесь основную роль играют тестикулы самого эмбриона. Сустентоциты вырабатывают белок – антимюллеровый фактор (АМФ). Таким образом развитие мюллеровых протоков останавливается. Интерстициальные эндокриноциты в этот период активно пролиферируют и заполняют все пространство между каналцами (Мутовин Г.Р., 2009).

Вырабатываемый интерстициальными эндокриноцитами тестостерон приводит к дифференцировке семенных пузырьков, выносящих протоков и придатка семенника из вольфовых протоков. Клетки Лейдига синтезируют

тестостерон благодаря влиянию плацентарного ХГЧ, а затем собственного ЛГ. На 14 неделе эмбриогенеза уровень тестостерона сопоставим с пубертатными значениями. Половые гормоны тестостерон и дигидротестостерон непосредственно участвуют в развитии простаты и наружных половых органов. Это происходит благодаря связыванию их с андрогеновыми рецепторами. (Дедов И.И., 2002).

Таким образом, отсутствие или дефицит андрогенов в процессе эмбриогенеза может привести к различным аномалиям развития пола, например, гипоспадии, крипторхизму или женскому строению наружных половых органов (Уварова Е.В., Трифонова Е.В., 2008).

Анализ литературных данных показал, что в течение формирования любого органа и ткани есть наиболее чувствительные периоды, когда патологические факторы могут привести к дефектам в развитии. Различные патологические воздействия на плод приводят к нарушениям того органа, который находится на этапах роста и дифференцировки. Изменения, произошедшие в критические периоды, имеют необратимый характер, поскольку строение и функция приобретают законченную форму (Отеллин В.А., 2004).

Воздействие гипоксии на развивающуюся половую систему может нарушать дальнейшее ее развитие и приводить к негативным последствиям. Наиболее пагубно воздействие гипоксии в критические периоды онтогенеза репродуктивного аппарата, когда плод становится уязвимым и высоко восприимчивым по отношению к внешним воздействиям.

Первая половина беременности (до 20 недель) угрожаема по развитию аномалий половой системы у плода, поскольку интенсивное развитие полового тракта отмечается в 8-12 недель. Необходимо отметить, что влияние гипоксии как повреждающего фактора является важным и во втором и третьем триместрах беременности, когда происходит рост плода.



## **1.2. Влияние гипоксии на развитие плода в антенатальном периоде**

Гипоксия выступает на первом месте среди причин гибели плода в антенатальном периоде. Кислородное голодание приводит к выраженным переменам обменных процессов, нарушениям кровообращения и микроциркуляции у каждого второго ребенка при рождении и дезадаптации организма у 50-75 % детей в ранний неонатальный период (Омуркулова Г.С., 2009). Среди перечисленных факторов риска нарушений развития плода важное место занимает гипоксия. Гипоксия плода является одним из самых часто встречающихся осложнений при беременности и родах (Юнусова Ю.Р., 2015; Кузнецов П.А., 2017). Хроническая кислородная недостаточность сопровождает многочисленные патологические состояния беременности, в том числе, инфекционные заболевания женщин, гипертензию различного происхождения (Карпова И.Ю. и др., 2011, Маслякова Г.Н. и др., 2015).

Принято, что гипоксия плода представляет собой патологическое состояние, в основе которого лежит недостаточное снабжение кислородом тканей и органов плода или неадекватная способность тканей и органов к утилизации кислорода.

В настоящее время роль кислорода в развитии плода остается дискуссионной. Было высказано предположение, что гипоксия на ранних сроках беременности может быть тератогенной для эмбриона человека (Blais L., Beauchesne M.F., 2004). Ряд авторов (Hutter D., Kingdom J., 2010) считают, что гипоксия не играет главной роли на этапе раннего развития плода, потому что период раннего эмбриогенеза проходит в анаэробных условиях, а гипоксия становится более важной во втором и третьем триместре беременности, когда происходит рост плода.

Исследования V. Verratti, F. Berardinelli (2008) и J.G. Reyes, J.G. Farias (2012) показывают, что не только при гипоксии, но и при варикоцеле и перекруте яичка у плода развиваются общие признаки повреждения - апоптоз половых клеток и повреждение ДНК, что может воздействовать на клетки Лейдига и в дальнейшем привести к развитию бесплодия.

Существует теория, согласно которой неблагоприятная внутриутробная среда может влиять на экспрессию генов плода и оказывать влияние на состояние здоровья в долгосрочной перспективе. Дефицит кислорода, недостаток гормонов и других питательных веществ нарушает формирование тканей. Репрограммирование физиологических систем происходит на генном, клеточном, тканевом и органном уровнях. Этот принцип впервые был введен Дэвидом Баркером и его сотрудниками в начале 90 - х годов. Гипотеза фетального программирования заболеваний взрослых и в настоящее время поддерживается широкими научными исследованиями (Barker D.J., Eriksson J.G., 2002; Thompson L.P., 2012; Kwon, E.J., Kim Y.J., 2017).

Несмотря на убедительные эпидемиологические данные, подтверждающие теорию «программирования плода», основные механизмы его развития остаются неизвестны. Некоторые авторы предполагают, что окислительный стресс, который развивается на фоне гипоксии, инфекционных поражений, диабета, гестоза у матери, может являться триггером для увеличения свободных радикалов и повреждения тканей плода (Perrone S., Santacrose A., 2016).

По течению гипоксия может быть острой и хронической. Острая гипоксия плода часто встречается интранатально. Хроническая гипоксия развивается в процессе гестации. Многочисленные этиологические факторы, способствующие формированию гипоксии плода, можно разделить на три группы. К первой группе относятся сердечно-сосудистые заболевания, болезни органов дыхания, анемия, отравления, шок различной этиологии. Вторую группу, которая является наиболее обширной, составляют токсикозы и гестозы,

преждевременные роды, аномалии расположения плаценты, перенашивание беременности, патология пуповины. В третью группу входят заболевания плода: анемия, гипотензия, врожденные пороки развития (Саргсян О.Д., 2014).

По механизму развития выделяют гипоксическую, гемическую, циркуляторную и тканевую гипоксию. При гипоксической гипоксии плод не получает достаточного количества кислорода от матери, что может быть связано с заболеваниями самой матери (патология легких, сердечно-сосудистые заболевания), так и с патологией плаценты. Гемическая гипоксия возникает из-за нарушения связывания кислорода эритроцитами плода (гемолитическая болезнь плода и др.). Циркуляторная гипоксия возникает вследствие сдавления пуповины, пороков сердца плода. Тканевая гипоксия развивается на фоне патологии ферментных систем плода, когда кислород не усваивается тканями (Рябова С.А., 2017).

Известно, что плод развивается в условиях пониженной оксигенации, и, чтобы противостоять уменьшению поступлению кислорода, его клетки и органы выработали компенсаторные реакции на гипоксию в процессе эволюции (Giussani D.A., 2016). Однако таких систем толерантности иногда недостаточно для защиты развивающегося организма от острого или хронического снижения снабжения кислородом, вызванного различными патологическими состояниями (Gunn A. J., Bennet L., 2009).

На тканевом уровне гипоксическое состояние вызывает неоваскуляризацию, расслабление гладких мышц и расширение сосудов, что повышает кровоснабжение тканей и компенсирует недостаток кислорода (Farias J.G., 2008; Reyes J.G., 2012). Повышенное кровенаполнение органа приводит к местному повышению температуры, однако для яичек этот процесс является неблагоприятным (Farias J.G., Bustos-Obregón E., Tapia P.J., et al., 2008), так как он активирует апоптоз в клетках семенных канальцев яичка.

Процесс ангиогенеза включает состоит из нескольких этапов: пролиферация, дифференцировка и миграция эндотелиальных клеток, образование и созревание сосудов. Все это обусловлено факторами роста, и в частности, фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) . Увеличение секреции VEGF и экспрессии рецепторов в клетках, подверженных гипоксии, опосредуется индуцированным гипоксией фактором 1 (HIF-1).

HIF-1 - это гетеродимерный транскрипционный фактор, состоящий из двух субъединиц - HIF-1  $\alpha$  и HIF-1  $\beta$ , которые контролируют экспрессию многочисленных белков, связанных с клеточным гипоксическим ответом (Brück R.K.,2003 ). HIF-1  $\beta$  - субъединица представляет собой ядерный белок, который не реагирует на изменения уровня кислорода, в то время как HIF-1  $\alpha$  - субъединица является гипоксией-индуцируемым белком (Wang G.L., Semenza G.L.,1995). Когда клетки подвергаются воздействию гипоксии или возникает преходящая ишемия, происходит быстрое (в течение нескольких минут) накопление HIF-1  $\alpha$ .

Из огромного числа генов, индуцированных HIF-1, одним из наиболее важных является васкулоэндотелиальный фактор роста -VEGF, который был описан в клетках Сертоли и Лейдига (Nalbandian A., Dettin L., Dym M., Ravindranath N., 2003; Moon E.J. et al. 2007).

VEGF представляет собой гомодимерный, дисульфидсвязанный гликопротеин, участвующий в ангиогенезе. Он оказывает сильное влияние на проницаемость, является мощным ангиогенным белком и принимает участие в процессах неоваскуляризации в патологических ситуациях. VEGF является ключевым регулятором роста и проницаемости эндотелия. Однако имеются данные о том, что VEGF может экспрессироваться и в неэндотелиальных клетках, например в клетках трофобласта при гипоксии (Potter C.P., 2003; Zhang R., Pan X.H., 2015), в сердечно-сосудистой системе (Miquerol L., Langille B.L., 2000). В ткани яичек также были обнаружены рецепторы VEGF (VEGFR) в

клетках Сертоли и Лейдига, в клетках сперматогенного эпителия (Ziello J.E., 2007; Naase V.H., 2010; Sargent, K.M et al ., 2015). При идиопатическом бесплодии исследователи отмечали выраженную экспрессию VEGF в эндотелии кровеносных сосудов, клетках Лейдига, клетках Сертоли и сперматогониях. Была высказана роль VEGF в регулировании мужской фертильности (Кульченко Н.Г., Демяшкин Г.А., 2016).

Но в обзоре П.А. Кузнецова (2017) отмечено, что наиболее значимыми причинами гипоксии плода являются плацентарная недостаточность, пороки развития плода, компрессия пуповины и гипоксия матери, а основной причиной хронической гипоксии служит хроническая плацентарная недостаточность.

### **1.3. Плацента и плацентарная недостаточность**

Особенности развития гестационного процесса определяются характером взаимоотношений элементов системы мать-плацента-плод. В реализации плодово-материнских отношений главную связующую роль играет плацента. Она выполняет ряд очень важных функций: газообменную, трофическую, выделительную, защитную, гормональную. Различные повреждающие факторы, в том числе и гипоксия опосредуют свое влияние на плод через организм матери и плаценту (Кравцова Н.В., Черепкова Н.В., 2010).

На ранних сроках беременности низкий уровень кислорода является физиологичным и нужен для развития раннего плацентарного кровообращения. Увеличение пролиферации цитотрофобласта также было связано с гипоксией как в естественных условиях, и в эксперименте (Leese H.J., Sturmeу R.G., 2007). Изменение в оксигенации может регулировать инвазию трофобласта и задерживать ремоделирование спиральных артерий и приводить к гипоксии плода. Такой механизм наблюдается при поздних гестозах, диабете и других заболеваниях (Щербаков В. И., Рябиченко Т.И., 2013).

Сегодня доказано, что причиной снижения энергетических процессов при гипоксии являются изменения активности митохондриальных ферментов на субстратном участке дыхательной цепи, где ведущую роль играет HIF-1 (гипоксия индуцированный фактор), синтез которого начинается по сигналу от сукцинат-зависимого рецептора GPR 91 (He W., Miao F.J., Lin D.C. et al., 2004).

Гипоксия влияет на развитие плаценты, включая регуляцию ангиогенных медиаторов, таких как васкуло-эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста плаценты и ангиопоэтины (Munaut C., Lorquest S., Requex C., 2008).

Таким образом, гипоксия регулирует развитие плаценты и ее функции с последующим эффектом на фетальное программирование. Адаптация плода может привести к проявляющимся позднее патологическим изменениям. Например, малая масса тела плода предрасполагает к развитию таких заболеваний, как диабет, ожирение, атеросклероз, гипертензия, патология почек (Khorram O., Khorram N. Momeni M., 2007). Список таких патологий постоянно расширяется. Так, J. G. Eriksson, K. L. Thornburg (2010) показали возможность пренатального происхождения рака легких.

Плацентарная недостаточность представляет собой одну из главных проблем современного акушерства и перинатологии. Признаки фетоплацентарной недостаточности обнаруживаются более чем у 30 % всех беременных (Симрок В.В., 2012). Плацентарная недостаточность при невынашивании встречается в 50-77 % случаев, при преэклампсии – в 32 %, при сочетании беременности с экстрагенитальной патологией – в 25-45 % (Макацария А.Д., Бицадзе В.О., 2016).

В структуре перинатальной патологии и смертности плацентарная недостаточность и задержка развития плода составляют 40 %, а в составе с другими аномалиями достигают 69 % (Саргсян О.Д., 2014).

В настоящее время существуют различные принципы классификации плацентарной недостаточности.

По срокам и механизму развития выделяют первичную и вторичную плацентарную недостаточность. Первичная плацентарная недостаточность развивается до 16 недели под влиянием различных патологических факторов (генетические, инфекционные, эндокринные). Она может привести к развитию врожденных пороков плода, а также к неразвивающейся беременности. Вторичная (поздняя) плацентарная недостаточность развивается после 16-й недели беременности из-за нарушения маточного кровотока вследствие таких факторов, как артериальная гипо- или гипертензия, изменения реологических свойств крови, воспалительные реакции в организме матери (Симрок В.В., 2012).

По клиническому течению плацентарная дисфункция может быть острой и хронической, которая, в свою очередь, может быть компенсированной, субкомпенсированной и декомпенсированной.

При острой плацентарной недостаточности развивается полнокровие плаценты, образуются крупные гематомы на материнской поверхности и под амнионом. При гистологическом исследовании определяется диффузная гиперемия ворсинчатого хориона, увеличение количества терминальных ворсин, содержащих 5 и более капилляров с развитием очагового ангиоматоза. Масса последа обычно больше нормы в 1,5-2 раза (Саргсян О.Д., 2014; Макацария А.Д., Бицадзе В.О., 2016).

Хроническая компенсированная плацентарная недостаточность характеризуется умеренными инволютивно-дистрофическими изменениями и значительными компенсаторно-приспособительными реакциями в виде развития синцитиокапиллярных мембран и васкуляризации ворсин. При субкомпенсированной форме происходит нарушение созревания ворсин и утолщение мембран. При декомпенсированной дисфункции плаценты наблюдается слабая васкуляризация ворсин, низкое содержание синцитиокапиллярных мембран, склероз стромы ворсин (Макацария А.Д., Бицадзе В.О., 2016).

По виду нарушения обменных процессов различают две формы плацентарной дисфункции. К первой относится трофическая недостаточность (нарушение абсорбции и усваивания питательных веществ и генерация собственных метаболитов). Вторая форма - дыхательная недостаточность (нарушение транспорта кислорода в маточно-плацентарном кровотоке).

При компенсированной плацентарной недостаточности наблюдаются начальные признаки гипоксии плода, при субкомпенсированной и декомпенсированной формах течения они могут быть умеренными или выраженными и наблюдается задержка антенатального развития плода (Кулаков В.И., 2004; Сидорова И.С., 2005; Макацария А.Д. 2016).

Таким образом, единого принципа классификации плацентарной недостаточности нет. Однако все авторы солидарны в том, что нарушения кровообращения в системе «мать-плацента-плод» ведут к повреждению плаценты, вследствие чего развиваются повреждения плода и его систем.

#### **1.4. Морфология яичек плодов и новорожденных при влиянии повреждающих факторов**

Морфологическое исследование является важным составляющим звеном в диагностике различных патологических процессов. Четкие знания о том, какие структурные изменения в организме вызывает действие различных повреждающих факторов, помогают правильно диагностировать, а также выстраивать определенное представление о течении и исходе патологического процесса (Чехонацкая М.Л., Колесникова Е.А., 2013). С помощью современных методов морфологического и иммуногистохимического исследования возможно изучить изменения клеток и тканей в динамике, а также оценить функциональные изменения органа.



Исследования М.С. Артифексовой (2009) показали, что у плодов с аномалиями полового развития наблюдается задержка формирования гонад. Так, структурная организация ткани яичек у плодов 20 недель и старше соответствовала более раннему периоду эмбриогенеза. Также авторы отмечали диссонас в развитии семенных канальцев и интерстициальных клеток Лейдига. Однако, стоит отметить, что морфометрического и иммуногистохимического исследования этих структур проведено не было.

Исследования С.А. Шерстюка (2014) были направлены на выявление особенностей строения яичек мертворожденных от ВИЧ-инфицированных матерей. Он показал, что развитие семенников происходило по гипопластическому типу. Это выражалось в уменьшении объема канальцев и количества клеток сперматогенного эпителия, а также в разрастании соединительной ткани. Он связал подобные изменения с угнетением активности гонадотропинов аденогипофиза, а также высказал предположение о влиянии внутриутробной гипоксии. Подавление функциональной активности всей популяции клеток семенников может свидетельствовать о нарушении компенсаторных возможностей органа, которое в дальнейшем может стать причиной развития первичного бесплодия. Но и в этом случае не было иммуногистохимического подтверждения описанного.

Морфофункциональное состояние репродуктивного аппарата на момент рождения ребенка является свидетельством тяжести и продолжительности антенатальной гипоксии (Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., 2016).

Исследования С.Н. Потапова (2010) были посвящены морфофункциональным особенностям яичек плодов, полученных от матерей, страдавших преэклампсией. Автор показал, что в тканях яичек плодов, полученных от матерей с преэклампсией легкой степени тяжести, наблюдается пролиферация и апоптоз половых клеток и клеток Лейдига, причем пролиферативные процессы преобладают. При эклампсии средней и тяжелой

степени автор отмечал преобладание апоптоза в зародышевых клетках. В интерстиции наблюдалось увеличение количества сосудов во всех группах наблюдений. В группе тяжелой степени преэклампсии ангиогенез был максимально выражен.

В последнее время для выяснения нарушений в репродуктивной сфере, в частности, причины мужского бесплодия, проводят иммуногистохимическое исследование андрогенового рецептора (Arenas M.I., 2001; Rey R.A., 2009; Connoly F. et al., 2013).

Известно, что в период эмбриогенеза андрогены принимают активное участие в дифференцировке наружных половых органов.

По данным Chang C., Chen Y.T. (2004), андрогеновые рецепторы в тестикулах присутствуют в интерстициальных эндокриноцитах, клетках Сертоли и перитубулярных миоидных клетках.

Connoly F. et al. (2013). отмечают, что нарушение экспрессии андрогенового рецептора, будет сопровождаться аномальным развитием или недоразвитием внутренних и наружных органов мужской половой системы

Морфологические работы по особенностям экспрессии рецепторов андрогенов при гипоксии в семенниках плода единичны.

Известно, что гипоксия повреждает герминативный эпителий и снижает выработку половых гормонов, что негативно влияет на формирование тестикул. Одним из признаков гормональной активности гонад служит уровень тестостерона в крови.

Rae M. T. (2002), Al-Adami M.S. (2011) изучали уровень тестостерона в крови новорожденных, страдавших внутриутробной гипоксией. При гипоксии легкой и средней степени тяжести авторы фиксировали увеличение уровня тестостерона в крови, что связывали с адаптационной реакцией организма. Тестостерон обладает известным расслабляющим действием на гладкую мускулатуру, оказывая в течение короткого времени сосудорасширяющее

действие. Гипоксия тяжелой степени приводила к снижению уровня полового гормона.

Тестостерон также играет роль в высотной адаптации благодаря его идентичности эритропоэтическому гормону (Gonzales G.F.,2011). Таким образом, тестостерон может играть определенную роль в ранних сосудистых изменениях в семеннике при гипоксии, действовать как паракринный регулятор.

Ж.С. Вишнякова (2014) в своих исследованиях показала, что у новорожденных детей с хронической внутриутробной гипоксией в анамнезе содержание оксида азота повышено, а также усилена активность ангиотензинпревращающего фермента по сравнению с нормой. Ей было высказано предположение, что оксид азота и ангиотензинпревращающий фермент участвуют в развитии компенсаторных реакций в условиях дефицита кислорода.

Т.Б Воробьева (2011) в своем исследовании показала, что в условиях антенатальной гипоксии в пуповинной крови и в плаценте снижается уровень таких белков, как альфа-фетопротеин, трофобластический бета-глобулин, термостабильная щелочная фосфатаза. Данные плацентарные и эмбриоспецифические гормоны играют важную роль в развитии и формировании плода.

Изучение и анализ литературы показали, что работ, посвященных выяснению морфофункциональных особенностей тканей яичек плода в условиях гипоксии немного. Отсутствуют сведения о морфологии яичек плода при хронической гипоксии в процессе его развития. Не изучена динамика пролиферативной и апоптотической активности семенника.

### **1.5. Экспериментальные исследования влияния гипоксии на развитие репродуктивной системы**

Обзор литературы в этой области показал, что структурные изменения семенников при патологическом течении беременности явились объектом изучения в многочисленных экспериментальных исследованиях. В то же время значение гипоксии для развития и функции органов плода человека, и, в частности, его репродуктивной системы, изучено недостаточно.

Важным моментом для выяснения пато- и морфогенеза патологического процесса является воспроизведение его в эксперименте. В экспериментальном исследовании трудно создать точную модель патологического состояния человека, так как его болезни неразрывно связаны с внешними условиями, своеобразием нейрогуморальной регуляции. Но, несомненно, для более полного и глубокого понимания механизмов нарушений, модельные эксперименты необходимы (Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., 2019).

В литературе имеются работы по влиянию хронической гипоксии на потомство и их соматометрические показатели. В.Д. Марковским и И.В. Сорокиной (2014) была смоделирована хроническая внутриутробная, острая постнатальная и смешанная гипоксия. Было отмечено достоверное уменьшение крысят в помете при моделировании смешанной гипоксии и недостоверное снижение крысят в помете при моделировании хронической и острой постнатальной гипоксии. Действие хронической внутриутробной гипоксии приводило к угнетению соматометрических показателей у плодов и новорожденных. Морфология отдельных систем, в частности репродуктивной системы, ими не изучалась.

Н.Н. Шевлюк (2007) моделировал действие экстремальных дестабилизирующих факторов и наблюдал дистрофию и очаговую атрофию эпителия канальцев в яичках лабораторных животных. В межканальцевой ткани

автор отмечал разрастание соединительной ткани, снижение количества и функциональной активности клеток Лейдига. Данные морфологические изменения сопровождались снижением уровня тестостерона в крови у лабораторных животных. Однако иммуногистохимическое исследование маркеров апоптоза и половых гормонов в этом исследовании проведено не было.

В исследованиях И Ю. Саяпиной, С.С. Целуйко (2011) было изучено изменение численности клеток Лейдига крыс в условиях низких сезонных температур. Исследователями было установлено, что на ранних сроках адаптации происходит уменьшение размеров клеток, а также снижается их функциональная активность. В дальнейшем наблюдается снижение численности интерстициальных эндокриноцитов, а в более поздние сроки адаптации, несмотря на снижение относительного количества клеток Лейдига, увеличиваются их размеры и повышается их функциональная активность. При этом другие параметры ткани яичка ими не изучались.

J.X. Liu , J.Z. Du (2002), а также Н. М. Mohammed, M.D. Tingari (2016) проводили экспериментальное исследование по воздействию хронической гипобарической гипоксии на развитие половой системы у крысят. Они подвергали их действию высотной гипоксии от момента рождения до 45 дня. У новорожденных крысят опытной группы авторы отмечали уменьшение как общей массы тела, так и яичек по сравнению с контролем. При микроскопическом исследовании тканей яичек новорожденных крысят они наблюдали уменьшение диаметра канальцев, отек стомы, жировую дистрофию интерстициальных эндокриноцитов. У половозрелых самцов отмечали дегенерацию и атрофию сперматогенного эпителия.

V. Rampanini (2017) исследовала влияние внутриутробной гипоксии, вызванной путем лигирования маточной артерии, на развитие постнатальных семенников. Было выявлено изменение экспрессии более 30 генов, отвечающих

за работу клеток Сертоли и Лейдига. Другие механизмы гипоксии в этой работе изучены не были.

Е. Madrid (2011) в своем исследовании отмечал повышение уровня тестостерона в крови и ткани яичка в первые 3 суток при действии нормобарической гипоксии. Затем показатели тестостерона выравнивались, а к 20-му дню значительно снижались. Но гистологические изменения при этом не изучались.

Все это указывает на то, что в экспериментальных исследованиях по влиянию хронической внутриутробной гипоксии на развитие яичек плодов отсутствуют систематизированные сведения о морфометрических показателях гонад, не изучены морфофункциональные и иммуногистохимические изменения клеток органа, в том числе, в половозрелом возрасте.

Таким образом, комплексное клинико-экспериментальное исследование структурных и функциональных изменений репродуктивной системы позволит выявить ряд морфологических особенностей характерных для формирования яичек в условиях патологического течения беременности.

## **Глава 2. Материалы и методы. Дизайн эксперимента**

### **2.1. Общая характеристика исследуемых объектов**

Диссертационное исследование выполнено на базе кафедры патологической анатомии и центра коллективного пользования Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Исследования проводили на клиническом и экспериментальном материале.

В клинический раздел работы были включены 78 плодов, погибших на сроке гестации 19-40 недель, за период 2012-2020 г. Исходя из задач исследования, материал разделили на основную группу и группу сравнения.

В основную группу вошли 47 плодов 19 - 40 недель гестации. Причинами смерти плодов данной группы стали: пороки развития, гестозы тяжелой степени, инфекционные заболевания матери с последующим инфицированием последа. При проведении аутопсии и исследовании плаценты выявляли признаки хронической плацентарной недостаточности и внутриутробной гипоксии плода, что являлось главным критерием включения в основную группу.

В группу сравнения вошел 31 плод со сроком гестации от 19 до 40 недель. Данный материал был получен в ходе прерывания беременности или в результате преждевременной отслойки плаценты. При исследовании плаценты признаки хронической плацентарной недостаточности были слабо выражены.

В каждом случае изучали историю родов, протокол патологоанатомического исследования. Во всех случаях проводили изучение плаценты. Плоды и плаценты исследовали в соответствии с установленными рекомендациями. В качестве гестационного возраста рассматривали акушерский срок гестации.

Материалом для исследования в проведенной работе послужили яички плодов, изъятые при вскрытии. Макроскопически определяли линейные размеры и массу яичек. Затем гонады фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина.

Во время аутопсии измеряли длину плода, определяли массу тела и последа и рассчитывали плацентарно-плодовый коэффициент. Обычно его измеряют у доношенных новорожденных и этот показатель равен 0,11-0,15 (Милованов А.П., 1999; Иванова Л.А., Карпов К.П., 2017).

Распределение изучаемых случаев выборочной совокупности антенатального периода представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Количество наблюдений в возрастных группах

Срок гестации	Основная группа n= 47	Группа сравнения n= 31
19-22 недели	15	10
23-25 недель	14	8
26-29 недель	9	7
30-40 недель	9	6

Для оценки влияния хронической гипоксии на формирование яичек у крыс было проведено экспериментальное исследование, одобренное локальным комитетом по этике (протокол №5 от 07.02.2017 г.). Данный раздел работы вели на базе центра коллективного пользования ФГБОУ ВО Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского (руководитель центра – доктор биологических наук Бучарская А.Б.).

В работе использовали 15 самок белых беспородных крыс в возрасте от 4,5 до 10 месяцев с массой 160-240 г. Лабораторные животные были случайным образом разделены на 3 экспериментальные группы, по 5 самок в каждой.



Животным I группы моделировалась гипоксическая гипоксия на протяжении всей беременности (21 день) по методике 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 II группы 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 III группы использовались в качестве контроля.

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 кровотоки 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 (IP) и систоло-диастолическое отношение (СДО), толщину плаценты.

После родоразрешения всего в помете насчитывалась 91 особь, в первой группе - 27, из них мужского пола - 11, во второй – 29, из них мужского пола 10 новорожденных, в контрольной группе всего 35, из которых 18 - мужского пола.

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 одинаковых условиях.

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

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с приказом Минздрава СССР от 12 августа 1977 года № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных (по состоянию на 20 октября 2006 года)»; Федеральным законом «О защите животных от жестокого обращения» от 1 декабря 1999 года; Женевской конвенцией «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990г.) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным, а так же с рекомендациями комитета по этике ФГБОУ ВО Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол заседания № 5 от 07.02.2017).

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Морфологические и морфометрические методы исследования семенников**

После стандартной гистологической проводки в спиртах возрастающей концентрации материал заливали в парафин. Срезы готовили с использованием роторного микротомы. Затем срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Морфометрические исследования и их анализ, а также фотографирование проводили с помощью Микровизора медицинского проходящего света  $\mu$ Vizo-101 (ЛОМО).

В клиническом разделе работы в тканях яичек плодов человека в десяти полях зрения каждого случая при увеличении 246,4 подсчитывали такие параметры, как количество, диаметр канальцев, количество сосудов. При увеличении 774 проводили подсчет количества клеток в канальцах, количества интерстициальных эндокриноцитов, измеряли высоту клеток в канальцах, площадь извитых семенных канальцев и площадь интерстициальной соединительной ткани.

В экспериментальной части работы на срезах яичек крысят в десяти полях зрения каждого случая при увеличении 774 подсчитывали следующие параметры: количество канальцев, их диаметр и количество клеток в них, количество сосудов в интерстиции, количество интерстициальных эндокриноцитов, площадь семенных канальцев и интерстиция. В тканях яичек половозрелых самцов определяли следующие признаки: диаметр канальцев, количество сперматогоний, индекс сперматогенеза. Индекс сперматогенеза рассчитывали путем отношения количества рядов сперматогенных клеток в семенном канальце к количеству канальцев в поле зрения.

### 2.2.2. Иммуногистохимическое исследование

Согласно стандартам иммуногистохимического окрашивания проводили ИГХ-исследование. В работе использовали системы визуализации и детекции: REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, USA), LSAB2 System, HRP (K0675) фирмы Дасо. В качестве хромогена использовали диаминобензидин (Дасо), и панель моно- и поликлональных антител (таблица 2).

Таблица 2 – Спецификация антител, используемых в работе

Антитело к антигену	Клон	Разведение	Фирма, страна производитель
Ki67	clone SP6, ab16667	1:100	ABCAM, UK
Bax	clone 100/D5, ab692	1:50	ABCAM, UK
Bcl 2	clone 124	1:100	Dako, UK
P 53	PAb 240, ab26	1:100	ABCAM, UK
VEGF	clone JH121, ab28775	1:50	ABCAM, UK
FGFR1	PAb, ab63601	1:50	ABCAM, UK
Androgen receptor	clone AR441, M3562	1:50	Dako, UK
Estrogen receptor $\beta$ 1	clone PPG5/10, M7292	1:20	Dako, UK

Характеристика иммуногистохимических маркеров:

1. Ki-67 – широко известный маркер пролиферации. Это ядерный белок, который экспрессируется во всех фазах митотического цикла (G1, S, G2 В М-фазах), кроме фазы покоя (G0). Во время интерфазы антиген определяется исключительно в ядре, в то время как в стадию митоза большее количество белка перемещается на поверхность хромосом.
2. Bax – белок, который локализуется в цитоплазме и выступает в качестве ингибитора роста. Экспрессия наблюдается в цитоплазме клеток и мембране митохондрий.

3. Bcl-2 – белок, локализующийся в цитоплазме и выступающий как ингибитор апоптоза. Экспрессируется в цитоплазме клеток.

4. P 53 – в зависимости от типа клеток может выступать в качестве ингибитора роста или вызывать апоптоз. Является одним из регуляторов клеточного цикла. Подавляя экспрессию специфических генов, блокирует деление клеток. Воздействуя на антигены Вах, Fas или Bcl-2, индуцирует апоптоз. Экспрессируется как в ядре, так и в цитоплазме.

5. VEGF – выступает в качестве фактора роста. Основная его роль – активация ангиогенеза. Данный маркер блокирует апоптоз клеток и стимулирует рост кровеносных сосудов. Экспрессия может быть мембранной и цитоплазматической.

6. FGFR 1 - фактор роста, участвующий в ангиогенезе, регенерации, эмбриогенезе. Факторы роста фибробластов играют ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки широкого спектра клеток и тканей. Экспрессия как ядерная, так и цитоплазматическая.

7. Androgen receptor – играет ключевую роль в правильном развитии и функционировании мужских репродуктивных органов. Экспрессия ядерная, однако, по данным литературы (Zhan Y., Zhang G., Wang X., Qi Y., Bai S., Li D. 2017; Kuasne H., Barros-Filho M.C., Marchi F.A., 2018) наблюдается и цитоплазматическая экспрессия.

8. Estrogen receptor – является ядерным рецептором, который реализует свои эффекты геномным и негеномным путями. Эстрогеновый рецептор является аутокринным и паракринным регулятором развития ткани яичка. Экспрессия ядерная, однако, по данным литературы (Raso M.G., Behrens C., Herynk M. H., Liu S., Prudkin L., 2009; Eliza Filipiak 2012), может наблюдаться и цитоплазматическая реакция.

С целью стандартизации и объективации результатов иммуногистохимического исследования окрашивание на каждый маркер

проводили одновременно для всех образцов тканей, а также использовали положительный и отрицательный контроль.

Результаты иммуногистохимического окрашивания оценивали так: считали процент клеток, давших положительную реакцию в 30 полях зрения, затем подсчитывали средний процент клеток с экспрессией. Степень выраженности иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

### **2.2.3. Статистические методы исследования и обработки данных**

Полученные результаты анализировали с использованием пакетов компьютерных программ SPSS Statistics 24.0.

Проверку выборочных совокупностей на нормальность распределения в группах проверяли с использованием 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 количественных признаков 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 двумя группами определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

### **Глава 3. Морфологические изменения у плодов и в плаценте при нарушении маточно-плацентарного кровообращения во время беременности**

Материалом для исследований стал секционный материал 78 случаев преждевременного прерывания беременности. Плодов со сроком гестации от 19 до 40 недель разделили на 4 группы, в зависимости от срока гестации: 19-22 недели, 23-25 недель, 26-29 недель, 30-40 недель. В каждой группе выделили по 2 подгруппы: группа плодов с острой гипоксией и группа плодов с хронической гипоксией. В основу деления на подгруппы была положена непосредственная причина гибели плодов, а также гистологическая картина плаценты. Данные о количестве случаев по группам и подгруппам представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Количество наблюдений в возрастных группах при острой и хронической гипоксии

Группа	Подгруппа	Количество случаев
Острая гипоксия	19-22 недели	10
	23-25 недель	8
	26-29 недель	7
	30-40 недель	6
Всего	19-29 недель	31
Хроническая гипоксия	19-22 недели	15
	23-25 недель	14
	26-29 недель	9
	30-40 недель	9
Всего	19-40 недель	47

### **3.1. Морфологическое исследование плодов и плаценты от матерей с патологией беременности, приводящей к острым нарушениям маточно-плацентарного кровообращения**

Из 78 наблюдений причиной гибели 31 плода в различные сроки гестации явилась острая гипоксия.

В сроки 19-22 недели гестации причинами развития острой внутриутробной гипоксии были: ВПР плода (5 случаев), самопроизвольный выкидыш при ЭКО (2 случая), преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты (2 случая), несостоятельность рубца на матке (1 случай).

Масса тела плодов колебалась в пределах от 455 г до 487 г (медиана 479 г). Плоды имели длину тела от 22 см до 24 см (медиана 23,5см). Возраст матерей составлял 24 - 35 лет (медиана 32 года).

Плаценты имели массу от 147 г до 193 г (медиана 166 г). Плацентарно-плодовый коэффициент в среднем был равен 0,34. При гистологическом исследовании плацент во всех случаях ворсинчатый хорион был представлен промежуточными недифференцированными ворсинами. Сосуды ворсин были расширены, полнокровны, наблюдались кровоизлияния в строму ворсин.

В сроки 23-25 недель причинами гибели плодов стала преждевременная прогрессирующая отслойка плаценты (4 случая), истмико-цервикальная недостаточность (2 случая), прерывание беременности по поводу ВПР плода (2 случая).

Масса тел плодов в этой подгруппе составляла от 554 г до 850 г (медиана 640 г) и длина тел колебалась в пределах от 27 до 34 см (медиана 31 см). Возраст матерей был от 20 до 35 лет (медиана 26 лет). Плаценты имели массу от 214 г до 228 (медиана 225 г). Плацентарно-плодовый коэффициент составил 0,35.



При гистологическом исследовании были выявлены морфологические признаки острой плацентарной недостаточности, декомпенсированной формы с нарушением маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровообращения. Преобладали промежуточные недифференцированные и дифференцированные ворсины. Отмечалось паретическое расширение сосудов ворсин. В межворсинчатом пространстве определялось большое количество свежих эритроцитов, а также массивные кровоизлияния в строму ворсин.

В сроки 26-29 недель гестации основной причиной смерти плодов во всех случаях (7) явилась преждевременная отслойка плаценты.

Плоды имели массу от 980 до 1090 г (медиана 1035 г) и длину тела от 32 до 40 см (медиана 36 см). Возраст матерей составлял 23 - 30 лет (медиана 24 года).

Масса плаценты менялась от 224 до 340 г (медиана 330 г). Плацентарно-плодовый коэффициент был равен 0,31. При гистологическом исследовании ворсинчатый хорион был представлен промежуточными дифференцированными, терминальными неспециализированными ворсинами. В единичных случаях встречались скопления фибриноида. Сосуды хориальной пластинки были паретически расширены, полнокровны. В межворсинчатом пространстве содержалось большое количество свежих эритроцитов (рисунок 1).

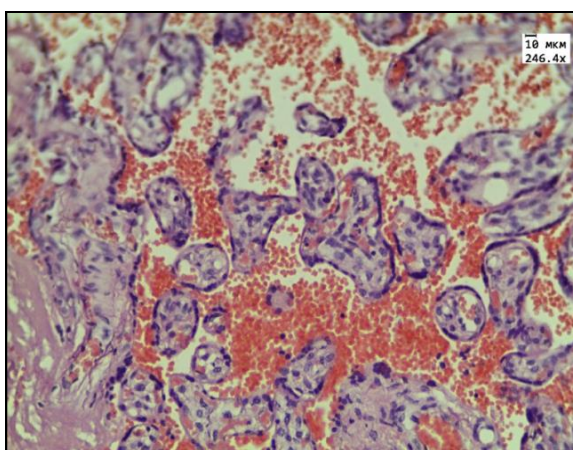


Рисунок 1 - Ткань плаценты при острой плацентарной недостаточности. Дифференцированные и терминальные ворсины, кровоизлияния в межворсинчатом пространстве. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув. 246,4.

В сроки 30-40 недель гестации причинами гибели плодов явились: антенатальная гибель плода (4) при преждевременной отслойке плаценты, прерывание беременности по поводу врожденной аномалии развития плода (2).

Плоды имели массу от 2517 до 3362 г (медиана 3260 г) и длину тела от 45 до 51 см (медиана 49 см). Возраст матерей составлял 31 - 34 года (медиана 33 года).

Масса плаценты колебалась от 375 до 482 г (медиана 437 г). Плацентарно-плодовый коэффициент в среднем составлял 0,13. При гистологическом исследовании преобладали терминальные и промежуточные дифференцированные ворсины. В межворсинчатом пространстве и плодовой части плаценты отмечали скопления фибриноида, единичные синцитиальные почки. Сосуды ворсин были паретически расширены, в межворсинчатом пространстве массивные очаги кровоизлияний.

Во всех перечисленных случаях гибель плодов наступала мгновенно или быстро, поэтому не могла привести к выраженным структурным изменениям в ткани яичек.

Данные о росто-весовых показателях плодов, массе плаценты и возрасте матери представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Росто-весовые показатели плодов, возраст матери и масса плаценты при остром нарушении маточно-плацентарного кровообращения

Срок гестации (недели)	Масса плода, г Me [25;75]	Рост плода, см Me [25;75]	Возраст матери, лет Me [25;75]	Масса плаценты, г Me [25;75]
19-22	479 [455;487]	24 [22;24]	32 [24,5;35]	166 [143;193]
23-25	640 [554;850]	31 [27;34]	26 [20;35]	225 [214;228]
26-29	1035 [980; 1090]	36 [32;40]	24 [23;30]	330 [224;340]
30-40	3260 [2517; 3362]	49 [45;51]	33 [31;34]	437 [375;482]

Матери плодов, погибших от острой асфиксии, имели следующую патологию беременности: отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (предшествующие самопроизвольные или искусственные аборты, рубец на матке, миома матки, поперечносуженный таз) наблюдался у 13 беременных (46 %); угроза прерывания беременности имела место в 11 случаях (39 %); экстрагенитальные инфекции – 8 случаев (28 %); анемия беременных – в 3 случаях (10 %). Из экстрагенитальной патологии чаще всего диагностировались вегето-сосудистая дистония, патология почек, ожирение – по 2 случая (7 %), и в единичных случаях наблюдалась гипертоническая болезнь, заболевание эндокринной системы, язвенная болезнь.

### **3.2. Морфологический анализ изменений у плодов и в плаценте при патологии беременности матери, развившейся на фоне хронических нарушений маточно-плацентарного кровообращения**

В 47 случаях из 78 зарегистрирована хроническая внутриутробная гипоксия плода. Во всех случаях матери имели патологию беременности и родов.

В сроки 19-22 недели (15 случаев) в 11 случаях было проведено прерывание беременности по медицинским показаниям ввиду пороков развития, в 2-х случаях развился самопроизвольный выкидыш; в 2-х случаях диагностировалась истмико-цервикальная недостаточность. Во всех случаях при морфологическом исследовании плаценты диагностировалось восходящее инфицирование, поэтому эти случаи были отнесены в подгруппу хронической гипоксии.

Возраст матерей составлял 25 – 35 лет (медиана 29 лет). Плоды имели массу от 420 г до 487 г (медиана 472 г) и длину тел от 20 до 25 см (медиана 23 см).

Масса плаценты колебалась в пределах от 204 до 216 г (медиана 212 г). Плацентарно-плодовый коэффициент в среднем был равен 0,44. Гистологически во всех случаях ворсинчатый хорион был представлен промежуточными недифференцированными ворсинами. В межворсинчатом пространстве определялись скопления эритроцитов. Сосуды ворсин расширены, полнокровные. В децидуальном слое плодных оболочек, хориальной пластинке, субхориальном межворсинчатом пространстве обнаруживалась умеренная или выраженная лейкоцитарная инфильтрация.

В сроки 23-25 недель у беременных были диагностированы следующие виды патологии: антенатальная гибель плода на фоне тяжелой преэклампсии (4), антенатальная гибель плода на фоне инфицирования последа (3), центральное предлежание плаценты с кровотечением (2), отслойка плаценты на фоне инфицирования последа (3), истмико-цервикальная недостаточность (2).

Масса тел плодов составляла от 596 г до 638 г (медиана 612 г), длина тел плодов - от 30 до 32 см (медиана 31 см). Беременные имели возраст от 30 до 38 лет (медиана 34 года).

Масса плаценты в данные сроки беременности составляла от 180 г до 270 г (медиана 209 г). Плацентарно-плодовый коэффициент составил 0,34. При гистологическом исследовании плаценты во всех 15 случаях выявлялись признаки субкомпенсированной или декомпенсированной плацентарной недостаточности – ишемические инфаркты, скопления фибриноида на поверхности ворсин, гиповаскуляризированные ворсины, преждевременное созревание ворсин (промежуточные дифференцированные и терминальные неспециализированные ворсины). В трети случаев (5) отмечались признаки восходящего инфицирования: париетальный гнойно-некротический децидуит, плацентарный гнойный хориоамнионит, субхориальный интервиллезит, гнойный фуникулит.

Возраст матерей, у которых прерывание беременности произошло в сроки от 26 до 29 недель составлял от 33 до 37 лет (медиана 34 года). Причиной летального исхода плодов в этой группе явились: внутриутробная асфиксия из-за хронической плацентарной недостаточности (8). У живорожденного ребенка, прожившего 2 суток, развилось внутрижелудочковое кровоизлияние 3 степени с развитием гиалиновых мембран в легких. Плоды имели массу от 690 до 995 г (медиана 750 г) и длину от 28 до 35 см (медиана 34 см).

Масса плаценты колебалась в пределах от 177 до 260 г (медиана 214 г). Плацентарно-плодовый коэффициент был равен 0,28. При гистологическом исследовании плаценты во всех 9 случаях выявлялись признаки субкомпенсированной или декомпенсированной плацентарной недостаточности – ишемические и геморрагические инфаркты, скопления фибриноида на поверхности ворсин, гиповаскуляризированные ворсины, патологическая незрелость плаценты (рисунок 2). В части случаев (4) отмечали развитие париетального гнойного децидуита.

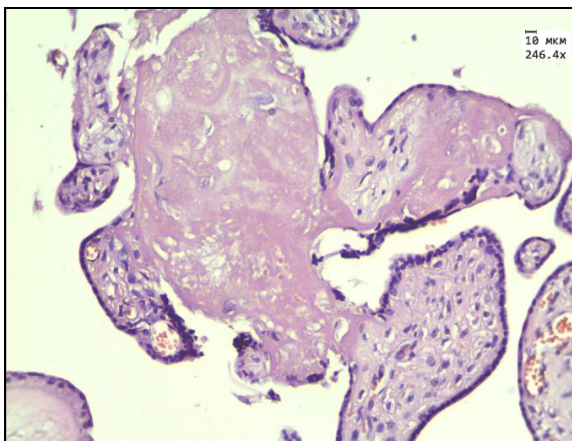


Рисунок 2 - Ткань плаценты при хронической плацентарной недостаточности. Недифференцированные и дифференцированные ворсины, скопления фибриноида. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.246,4.

В сроки 30-40 недель причиной гибели плодов были: внутриутробная гипоксия вследствие отслойки плаценты на фоне хронической плацентарной

недостаточности (4), прерывание беременности по поводу ВПР плода (3), множественные врожденные пороки развития плода (1), двусторонняя церебральная лейкомаляция (1).

Плоды имели массу от 1190 до 1810 г (медиана 1550 г) и длину тел - от 33 до 44 см (медиана 43 см). Возраст матерей изменялся от 30 до 35 лет (медиана 32 года).

Масса плаценты составляла от 205 до 334 г (медиана 300 г). Плацентарно-плодовый коэффициент был равен 0,19.

При гистологическом исследовании плаценты во всех 9 случаях выявлялись признаки субкомпенсированной или декомпенсированной плацентарной недостаточности – ишемические и геморрагические инфаркты, сужение межворсинчатого пространства, кровоизлияния в межворсинчатом пространстве, преждевременное созревание ворсин (промежуточные дифференцированные и терминальные неспециализированные ворсины). В трети случаев отмечали восходящее инфицирование: париетальный гнойный мембранит, субхориальный интервиллезит, гнойный фуникулит (рисунок 3).

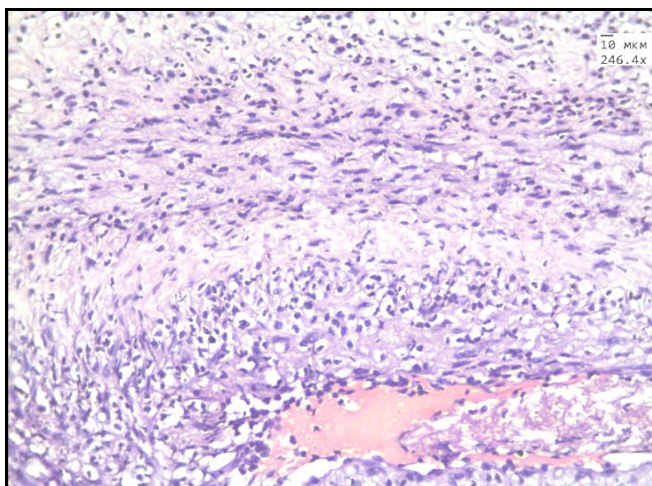


Рисунок 3 - Ткань плаценты при хронической плацентарной недостаточности. Диффузный гнойный мембранит. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.246,4.

Данные о росто-весовых показателях плодов, массе плаценты и возрасте матери представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Росто-весовые показатели плодов, масса плаценты и возраст матерей при хронической внутриутробной гипоксии плода

Срок гестации (недели)	Масса плода, г Me [25;75]	Рост плода, см Me [25;75]	Возраст матери Me [25;75]	Масса плаценты, г Me [25;75]
19-22	472 [420;487]	23 [20;25]	29 [25;35]	212 [204;216]
23-25	612 [596; 638]	31 [30;32]	33 [30;38]	209 [180;268]
26-29	750 [690; 995]	34 [27;35]	34 [33;36]	214 [177;257]
30-40	1550 [1190;1810]	43 [33;44]	32 [30;35]	300 [205; 334]

При рассмотрении данной группы можно отметить, что наиболее частыми патологическими состояниями во время беременности были инфекционные заболевания – в 37 случаях из 47 (78%), из них инфекционные заболевания гениталий - 23 случая (49%), а экстрагенитальные инфекции имели место в 16 случаях (34%). Чуть реже развивались гестозы – 31 случай из 47 (66%), из них тяжелые формы гестоза наблюдались в 17 случаях (35%), а легкие или средней степени тяжести в 14 наблюдениях (28%). Угроза прерывания беременности имела место в 43 случаях (91%); отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (предшествующие самопроизвольные или искусственные аборт, рубец на матке, миома матки, поперечносуженный таз) наблюдался у 40 беременных (85%). Анемия наблюдалась в 16 случаях (34%). Нарушение образования околоплодных вод было выявлено по данным историй родов у 20 (42%) беременных женщин, из них маловодие обнаружено в 8 (17%) случаях, многоводие в 12 (24%) случаях. Острая плацентарная недостаточность на фоне хронической выявлялась в 8 (17%) случаях.

Кроме патологических состояний, связанных с беременностью, в этой группе у женщин были диагностированы и экстрагенитальные заболевания, которые обострились или впервые появились во время беременности: патология

почек (пиелонефрит, поликистоз, диабетическая нефропатия и т.д.) – 4 (8%); ожирение – 3 (6%); гипертоническая болезнь – 2 случая (4%); болезни эндокринной системы (сахарный диабет 1 типа, узловой зоб) – 2 (4%); вегетососудистая дистония – 2 (4%), ВИЧ-инфекция – 1 (2%); носительство HVC-антигена – 1 (2%); токсоплазменная инфекция – 1 (2%).

Следует отметить, что в 31 случае (66%) из 47 исследуемых случаев наблюдалось сочетание двух или более патологических процессов у одной пациентки. Из 31 беременности с сочетанием патологических процессов в 16 (52%) случаях патология была не только сочетанной, но длительно и тяжело протекающей (например: отягощенный акушерско-гинекологический анамнез + гестоз второй половины беременности, тяжелая форма, длительное течение + хроническая плацентарная недостаточность, декомпенсированная форма + анемия и т.п.). Данные о патологических состояниях во время беременности представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Патологические состояния матери во время беременности

<b>Патологические состояния</b>	<b>Острая гипоксия</b>	<b>Хроническая гипоксия</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>ПАТОЛОГИЯ БЕРЕМЕННОСТИ</b>		
Угроза прерывания беременности	11 (39%)	43 (91%)
Инфекционные заболевания гениталий	-	23 (49%)
Экстрагенитальные инфекции	8 (28%)	16 (34%)
Гестозы	-	31 (66%)
Гестозы, тяжелые формы	-	17 (35%)
Гестозы легкой и средней степени тяжести	-	14 (28%)
Отягощенный акушерско-гинекологический анамнез	13 (46%)	40 (85%)
Анемия	3 (10%)	16 (34%)
Маловодие	-	8 (16%)



Продолжение таблицы 6

1	2	3
Многоводие		12 (24%)
Обвитие пуповиной	-	4 (8%)
<b>СОМАТИЧЕСКАЯ ПАТОЛОГИЯ</b>		
Гипертоническая болезнь	1 (3%)	2 (4%)
Ожирение	2 (7%)	3 (6%)
Заболевания почек	2 (7%)	4 (8%)
Болезни эндокринной системы	1 (3%)	2 (4%)
Вегетососудистая дистония	2 (7%)	2 (4%)
ВИЧ-инфекция	-	1 (2%)
НСV/гепатит С	-	1 (2%)
Токсоплазменная инфекция	-	1 (2%)
Желудочное кровотечение	1 (3%)	-

Таким образом, наиболее часто встречающимися патологическими процессами, обуславливающими хроническую гипоксию плода во время беременности явились: угроза прерывания беременности, инфекционные заболевания, экстрагенитальная патология и гестозы, что составило более 50%.

При сопоставлении клинических данных было установлено, что медиана возраста рожениц в группе с хронической гипоксией несколько больше, чем в группе с острой гипоксией плода. Это свидетельствует о том, что хроническая гипоксия плода чаще развивается у возрастных беременных.

Анализ росто-весовых показателей плодов показал, что, начиная с 26 недели беременности плоды в группе хронической гипоксии отставали в росте и имели меньшую массу, чем плоды, погибшие от острой асфиксии.

Масса плаценты при хронической гипоксии с увеличением срока гестации практически не изменялась, ее рост отмечали только в период 30-40 недель. Плацентарно-плодовый коэффициент в этой группе в срок гестации 30-40 недель был равен 0,19, что превышало показатели нормы.

#### **Глава 4. Морфометрическое исследование яичек плодов человека на разных сроках гестации, погибших от острой асфиксии**

Во время аутопсии изучали гонады макроскопически. Описывали форму яичек, регистрировали линейные размеры в миллиметрах (мм), определяли массу в миллиграммах (мг). Для удобства сравнения было введено понятие объема гонады:

Объем  $\text{мм}^3 = \text{длина, мм} * \text{ширина, мм} * \text{толщина, мм}$

Макроскопическая оценка проводилась у 78 плодов на сроке гестации от 19 до 40 недель, из них 31 плод 19-40 недель гестации составлял группу острой гипоксии, и 47 плодов 19-40 недель входили в состав группы хронической гипоксии.

В обеих группах яички имели овальную форму. Передняя поверхность их была выпуклой, задняя – плоской. В период 19-22 недели придаток семенника имел вид удлиненной округлой структуры, в 23-25 недель стало хорошо визуализироваться четкое разделение на анатомические части: головку, тело и хвост. Головка придатка располагалась на верхнем полюсе яичка. Цвет ткани яичек на разрезе менялся от бледно-желтого до синюшного. Поверхность разреза была гладкой, в некоторых случаях отечной.

Размеры гонад плодов, перенесших острую гипоксию, находились в пределах от 6х3х2 мм до 16х6,5х3 мм, при хронической гипоксии - от 6х3,5х2 мм до 11х6,5х2,5 мм. В обеих группах размер правого яичка был всегда больше левого, но не более чем на 3 мм. С увеличением срока гестации размер яичек увеличивался.

#### 4.1. Макроскопическая характеристика изменений яичек плодов, погибших от острой асфиксии

При аутопсии трупов плодов в период 19-22 недели гестации яички определялись в брюшной полости, с 23 до 29 недели гестации яички обнаруживались в паховом канале, а в период 30-40 недель гестации яички располагались в мошонке.

При макроскопическом исследовании было установлено, что в сроки 19-22 недели гестации масса правого яичка колебалась от 0,13 до 0,20 г (медиана 0,18 г), средние размеры были 6х3х2, объем гонады менялся от 27 до 51 мм<sup>3</sup> (медиана 36 мм<sup>3</sup>). Масса левого яичка была несколько меньше (медиана 0,14 г), а средние размеры и объем не отличались от правого яичка (таблицы 7,8).

Таблица 7 - Масса (мг) и объем (мм<sup>3</sup>) яичек при острой гипоксии

Срок гестации (недели)	Правое яичко		Левое яичко		Оба яичка	
	Масса Ме [25;75]	Объем Ме [25;75]	Масса Ме [25;75]	Объем Ме [25;75]	Масса Ме [25;75]	Объем Ме [25;75]
<b>19-22</b>	0,18 [0,13;0,20]	36 [27;51]	0,14 [0,10;0,17]	36 [24;40]	<b>0,16</b> [0,12;0,18]	<b>36</b> [24;42]
<b>23-25</b>	0,21 [0,19;0,21]	105 [90;120]	0,18 [0,16;0,20]	90 [64;99]	<b>0,2</b> [0,17;0,21]	<b>90</b> [85;114]
<b>26-29</b>	0,39 [0,36;0,42]	120 [105;140]	0,37 [0,34;0,39]	105 [80;124]	<b>0,38</b> [0,36;0,40]	<b>120</b> [90;133]
<b>30-40</b>	0,79 [0,73;0,83]	255 [174;313]	0,72 [0,64;0,80]	208 [133;283]	<b>0,77</b> [0,70;0,82]	<b>255</b> [149;297]

В сроки 23-25 недель гестации отмечалось увеличение массы и размеров яичек по сравнению с предыдущим периодом. Масса правого яичка также была

больше левого (медиана 0,21 г и 0,18 г соответственно), а линейные размеры имели незначительные различия. Так, размеры правого яичка составили 9,5х5,5х2, а левого 9х5х2 см (таблицы 7,8).

В последующем (26-29 недель) также отмечались некоторые различия по массе и линейным размерам. Так, по массе правое яичко превышало левое в среднем на 0,02 г (медианы веса 0,39 г и 0,37 г соответственно). Длина и ширина отличались на 0,5-1 см, толщина была постоянной (таблицы 7,8).

В период 30-40 недель гестации наблюдали значительное увеличение массы и линейных размеров яичек по сравнению с ранним периодом. Так, масса правого яичка в среднем была равна 0,79 мг, а левого 0,72 мг (таблицы 7,8).

Таким образом, в группе погибших плодов с острой гипоксией, с увеличением срока гестации происходило закономерное увеличение размеров, массы и объема яичек. Причем по всем этим показателям правое яичко всегда чуть превосходило параметры левого (таблицы 7,8).

Таблица 8 - Длина (мм) и ширина (мм) яичек при острой гипоксии

Срок гестации (недели)	Правое яичко		Левое яичко		Оба яичка	
	Длина Me [25;75]	Ширина Me [25;75]	Длина Me [25;75]	Ширина Me [25;75]	Длина Me [25;75]	Ширина Me [25;75]
<b>19-22</b>	6 [4,5;8,5]	3 [3]	6 [4,0;7,0]	3 [3]	<b>6</b> <b>[4,0;7,0]</b>	<b>3</b> <b>[3]</b>
<b>23-25</b>	9,5 [9,0;10,0]	5,5 [5,0;6,0]	9 [7,0;9,0]	5 [4,5;5,5]	<b>9</b> <b>[8,5;9,5]</b>	<b>5</b> <b>[5,0;6,0]</b>
<b>26-29</b>	10 [9,5;11,0]	6 [5,0;7,0]	9 [8,0;10,0]	5,5 [5,0;7,0]	<b>10</b> <b>[9,0;10,0]</b>	<b>6</b> <b>[5,0;7,0]</b>
<b>30-40</b>	16 [14,5;17]	8 [6;8]	14,5 [14;18]	4,5 [3,5;6,0]	<b>15,5</b> <b>[14,0;18,0]</b>	<b>6,5</b> <b>[5,0;8,0]</b>



Рисунок 4 - Яички плода на 21-22 неделе гестации.

#### **4.2. Гистологические и морфометрические изменения в тканях яичек плодов, погибших от острой асфиксии**

При изучении тканей яичек по срокам гестации при острой гипоксии нами было отмечено, что с увеличением срока гестации постепенно увеличиваются показатели практически всех структурных элементов половых желез: количество канальцев, количество клеток в канальцах, диаметр канальцев (таблица 9). Также с возрастом увеличивается площадь, занимаемая семенными канальцами, усиливается кровоснабжение органа. Для удобства сравнения таких показателей, как площадь паренхимы и стромы, ввели понятие паренхиматозно-стромальный индекс (ПСИ):

$$\text{ПСИ} = \frac{\text{площадь паренхимы, мкм}^2}{\text{площадь стромы, мкм}^2}$$

При обзорной микроскопии тканей яичек плодов 19-22 недель гестации под плотной соединительнотканной оболочкой располагались изогнутые, округлые и овальные семенные канальцы. Четкая базальная мембрана канальцев была образована поддерживающими клетками, вокруг извитых семенных канальцев перитубулярно в один или два ряда располагались фибробластоподобные и миоидные клетки. Просвет в канальцах отсутствовал. Клетки в канальцах

располагались хаотично, некоторые из них были дистрофически изменены. Клетки имели различную величину, но преобладали мелкие клетки.

Сперматогенный эпителий был представлен поддерживающими эндокриноцитами и разными подтипами половых клеток. Отчетливо выявлялись половые клетки. Они были крупных и средних размеров с хорошо выраженным ядром. половые клетки располагались как базально, так и в средней части семенных канальцев. Расположение половых клеток в извитых семенных канальцах было различно по отношению к базальной мембране. Так, они могли занимать как базальный отдел извитых семенных канальцев, так и среднюю часть канальца. Суспендоциты имели малые размеры и овальную форму.

Межканальцевая ткань была образована рыхлой соединительной тканью, богатой сосудами, в некоторых случаях с признаками отека. Четкого деления на дольки не наблюдалось. В строме в виде групп и изолированно располагались полигональные клетки с вытянутыми ядрами и крупные эозинофильные округлые клетки с большим ядром – интерстициальные клетки Лейдига (рисунок 5).

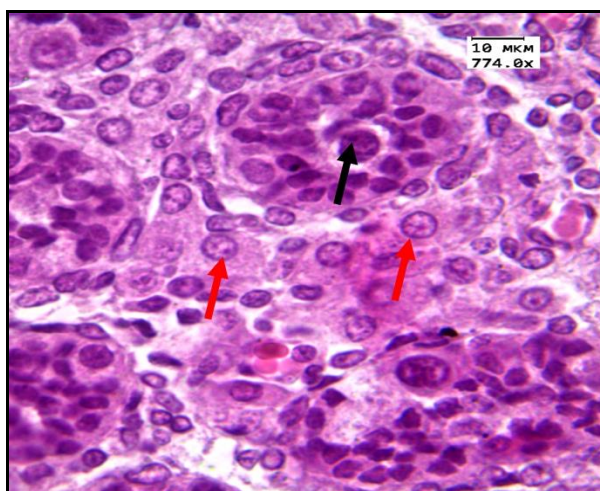


Рисунок 5 - Яичко плода 19-22 недель гестации. Красными стрелками отмечены клетки Лейдига, черными – гоноциты. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

Морфометрическое исследование тканей яичек в сроки 19-22 недели показало, что в среднем в одном поле зрения насчитывалось 18 канальцев, в просвете которых располагалось от 33 до 44 клеток (медиана 37 в одном канальце). Диаметр канальцев составил 0,052 мкм, а общая их площадь колебалась от 0,008 до 0,0123 мкм<sup>2</sup> (медиана 0,011). Площадь стромы находилась в пределах от 0,0087 до 0,0130 мкм<sup>2</sup> (медиана 0,01). ПСИ был равен 0,9. Количество сосудов в строме в среднем составило 5, а количество клеток Лейдига- 7 в поле зрения (таблица 9).

В период 23-25 недель гестации отмечалось преобладание канальцевой ткани. Семенные канальцы плотно располагались друг к другу. В некоторых случаях наблюдали большое количество крупных клеток в их просвете. Клетки сперматогенного эпителия находились ближе к базальной мембране, формируя просвет в извитых семенных канальцах. В строме по-прежнему наблюдалось большое количество клеток Лейдига. Отек имел разную степень выраженности. Сосуды были неравномерно полнокровны.

При морфометрическом исследовании в данный период было установлено, что диаметр и площадь канальцев возрастали, но незначительно, по сравнению с периодом 19-22 недели. Так, диаметр канальцев составлял 0,057 мкм, а площадь паренхимы была 0,0119 мкм<sup>2</sup> (в сроки 19-22 недели медиана этих показателей 0,052 и 0,011 соответственно). ПСИ увеличивался по сравнению с предыдущим периодом и был равен 1,3. Количество сосудов возрастало до 7 в поле зрения (таблица 9).

В сроки 26-29 недель канальцы содержали большое количество первичных гоноцитов, сперматогоний и незрелых поддерживающих клеток, плотно прилегающих друг к другу (рисунок 6). В части канальцев определялся просвет, клетки располагались упорядоченно. Канальцы формировали дольки, ограниченные друг от друга перегородками, состоящими из рыхлой стромы, содержащей значительное количество умеренно расширенных сосудов.

Межканальцевая соединительная ткань была местами отечна, в некоторых случаях наблюдался выраженный отек.

Таблица 9 - Морфометрические показатели тканей яичек при острой гипоксии

Показатель	Срок гестации, недели Медиана [25;75]			
	19-22	23-25	26-29	30-40
Количество канальцев в п/зр	18[14;19]	16[13;21]	18[16;19]	19[17;22]
Количество клеток в канальцах	37[33;44]	34[26;46]	38[34;46]	46[45;47]
Количество сосудов	5[3;8]	7[3;14]	7[3;11]	10 [9;11]
Количество клеток Лейдига	7 [5;11]	6[5;8]	5[5;7]	4 [4;5]
Диаметр канальцев, мкм	0,052 [0,050;0,058]	0,057 [0,050;0,061]	0,062 [0,055;0,068]	0,068 [0,067;0,070 ]
Высота клеток в канальцах, мкм	0,008 [0,007;0,009]	0,008 [0,007;0,009]	0,007 [0,006;0,008]	0,008 [0,008;0,008 ]
Площадь канальцев, мкм <sup>2</sup>	0,011 [0,008;0,0123]	0,0119 [0,0098;0,0124 ]	0,0127 [0,0106;0,0130 ]	0,0137 [0,0135;0,0138]
Площадь стромы, мкм <sup>2</sup>	0,01 [0,0087;0,0130 ]	0,0091 [0,0086;0,0112 ]	0,0083 [0,008;0,0104]	0,0076 [0,0075;0,0077]

В некоторых случаях наблюдалась отслойка сперматогенного эпителия от базальной мембраны извитых семенных канальцев. Сперматогенный эпителий в таких случаях выглядел более компактно. Просвет в извитых семенных канальцах сохранялся.



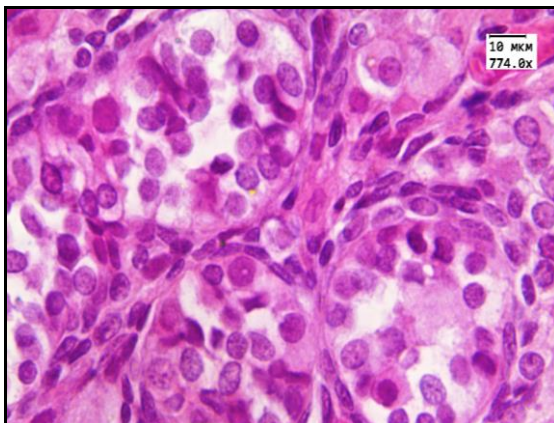


Рисунок 6 - Яичко плода 26-29 недель гестации. Плотное расположение семенных канальцев. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

При морфометрическом исследовании отмечалось увеличение диаметра канальцев (медиана 0,062), количества клеток в канальцах (медиана 38), и общей площади канальцевого аппарата (медиана 0,0127) по сравнению с предыдущими периодами (таблица 9). Соответственно наблюдали уменьшение площади, занимаемой стромой, до 0,0083 мкм<sup>2</sup> (в период 23-25 недель площадь стромы составляла 0,0091 мкм<sup>2</sup>), и ПСИ был равен 1,53. Количество сосудов не менялось.

В сроки 30-40 недель яички имели четкое дольчатое строение и состояли из изогнутых, местами соприкасающихся между собой семенных канальцев. В части канальцев наблюдался внутриканальцевый отек. Количество клеток Лейдига, по сравнению с предыдущими периодами, уменьшалось.

При морфометрическом исследовании наблюдали дальнейшее увеличение количества канальцев (медиана 19), диаметра канальцев (медиана 0,068), количества клеток в канальцах (медиана 46), и общей площади канальцевого аппарата (медиана 0,0137) по сравнению с предыдущими периодами (таблица 9). Площадь стромы уменьшалась до 0,0076 мкм<sup>2</sup>. ПСИ был равен 1,8. Количество сосудов увеличивалось (медиана 10).

При окраске препаратов пикрофуксином по Ван-Гизон отмечалась положительная реакция на соединительную ткань капсулы яичка, интерстиция семенника (рисунок 7).

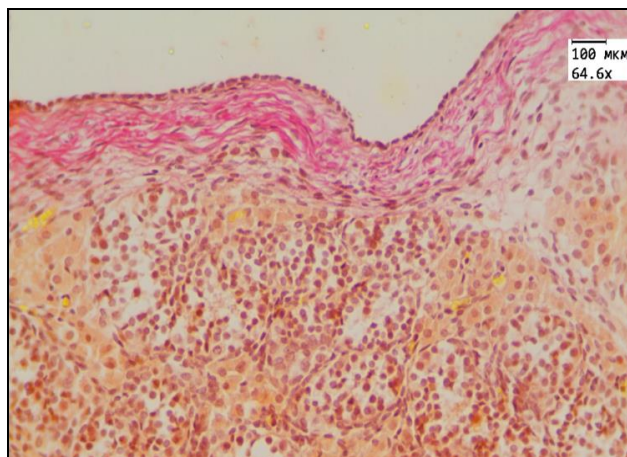


Рисунок 7 - Яичко плода 19-22 недель гестации. Положительная реакция на соединительную ткань капсулы яичка. Окр. Ван-Гизон. Ув. 64,6.

Таким образом, при макроскопическом исследовании в группе с острой гипоксией с увеличением срока гестации масса, линейные размеры и объем гонад увеличивались, причем правое яичко было несколько больше левого. В срок гестации 30-40 недель во всех случаях гонады располагались в мошонке.

При гистологическом изучении тканей яичек с увеличением срока гестации постепенно увеличивалось количество канальцев, количество клеток в них, диаметр канальцев, количество сосудов. Количество клеток Лейдига постепенно снижалось. На всех сроках гестации площадь паренхимы превалировала над площадью интерстиция.

### **4.3. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии маркеров пролиферации, апоптоза, фактора роста эндотелия сосудов и рецепторов эстрогена и андрогенов в яичках плодов при острой гипоксии**

Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в яичках плода при сроке гестации 19-22 недели при острой гипоксии была умеренной и слабой. Наблюдалась она в единичных клетках сперматогенного эпителия, главным образом в гоноцитах и в интерстиции.

При сроке гестации 23-25 недель иммуногистохимическая картина не менялась. Также отмечалась умеренная и слабая экспрессия маркера Ki67 в канальцах и строме. Индекс пролиферации колебался от 6 до 18%.

При сроке 26-29 недель гестации появлялась выраженная экспрессия в клетках сперматогенного эпителия, преимущественно в гоноцитах, в строме наблюдалась умеренная реакция (рисунок 8).

В отдельных полях зрения отмечалась очаговая интенсивная экспрессия маркера пролиферации Ki67 в клетках Лейдига. Индекс пролиферации увеличился более чем в 2 раза по сравнению с предыдущим периодом.

При сроке 30-40 недель гестации в отдельных клетках сперматогенного эпителия и интерстиции выявлялась интенсивная экспрессия маркера пролиферации. Индекс пролиферации по сравнению со сроком гестации 26-29 недель практически не менялся (медиана 30%).

Иммуногистохимическая характеристика маркера апоптоза Bcl 2 в тканях яичка плода при острой гипоксии независимо от срока гестации практически не менялась. Мы наблюдали умеренную и слабую экспрессию маркера в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и перитубулярных миоидных клетках. В эпителиоцитах канальцев экспрессии маркера не наблюдалось (рисунок 9)

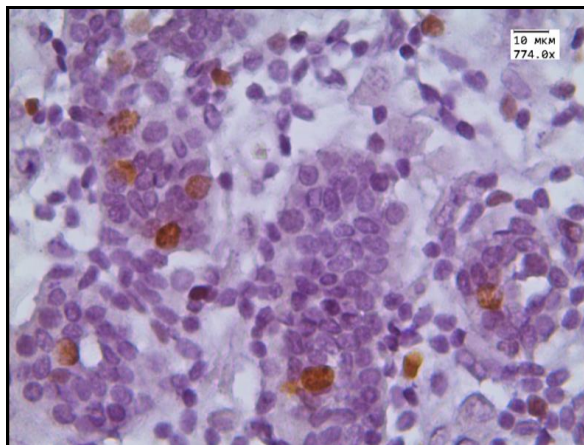


Рисунок 8 - Выраженная экспрессия маркера пролиферации Ki67 в эпителии канальцев тканей яичек у плода 26-29 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki67 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

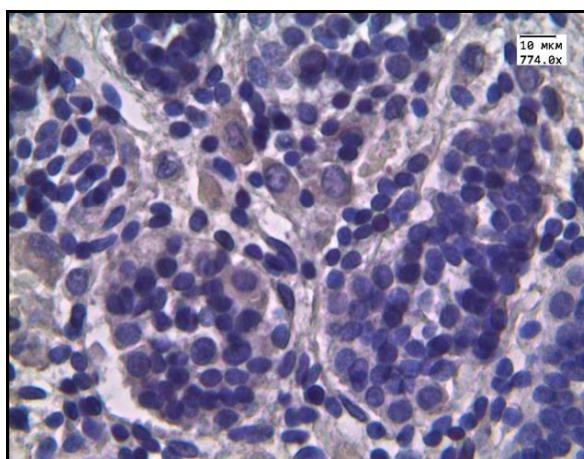


Рисунок 9 - Слабая экспрессия маркера апоптоза Bcl 2 в клетках Лейдига яичек у плода 30-40 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом Bcl2 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Цитоплазматическая экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF в тканях яичек плода при острой гипоксии была наиболее выраженной при сроке гестации 19-22 недели. Она наблюдалась в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и клетках сперматогенного эпителия.

При сроке 23-25 недель гестации наблюдалась умеренная и выраженная цитоплазматическая экспрессия фактора роста эндотелия сосудов. При сроках

гестации 26-29 и 30-40 недель гестации преобладала умеренная степень выраженности экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (рисунок 10).

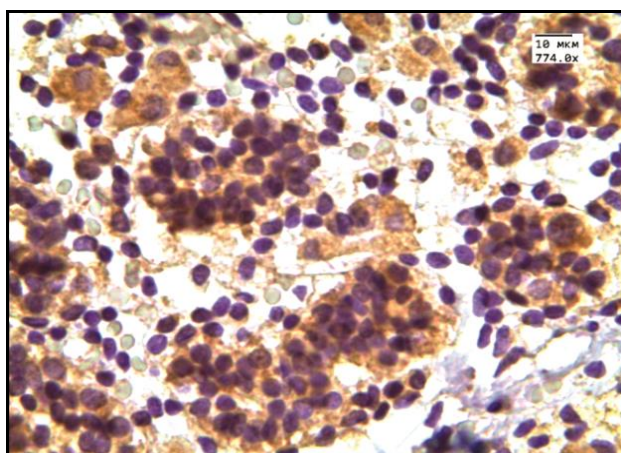


Рисунок 10 - Умеренная диффузная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF в канальцах и строме яичек у плода 26-29 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом VEGF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Таблица 10 - Зависимость экспрессии маркеров Ki67, Bcl2, ER, AR, VEGF, FGF от срока гестации при острой гипоксии

Срок гестации (недели)	Ki 67 Me [25;75]	Bcl 2 Me [25;75]	ER Me [25;75]	AR Me [25;75]	VEGF Me [25;75]	FGF Me [25;75]
19-22	12 [10;19]	11 [9;12]	16 [11;25]	90 [85;95]	95 [90;100]	36 [25;50]
23-25	12 [9;13]	22 [19;24]	15 [14;22]	85 [80;92]	70 [61;75]	60 [47;67]
26-29	32 [29;40]	11 [9;15]	1 [0;2]	50 [45;60]	75 [68;80]	65 [60;70]
30-40	30 [27;34]	7 [5;10]	4 [1;6]	43 [40;48]	71 [66;74]	11 [9;15]

Экспрессия эстрогенового рецептора ER при острой гипоксии при сроке 19-22 недели была умеренной и слабой. Наблюдалась она в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и клетках сперматогенного эпителия.



При сроке гестации 23-25 недель экспрессия эстрогенового рецептора сохранялась в интерстициальных эндокриноцитах (рисунок 11). В эпителии семенных канальцев экспрессия не наблюдалась.

При сроках гестации 26-29 и 30-40 недель экспрессия эстрогенового рецептора в канальцах и строме отсутствовала или была очень слабо выражена в единичных клетках.

Экспрессия андрогенового рецептора AR при сроке гестации 19-22 недели была слабой и умеренно выраженной. В отдельных полях зрения отмечалась ядерная экспрессия в перитубулярных клетках (рисунок 12).

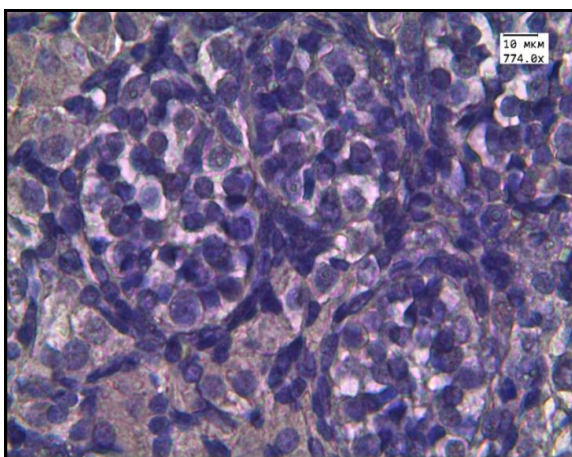


Рисунок 11 - Слабая экспрессия эстрогенового рецептора ER в клетках Лейдига яичек у плода 23-25 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом ER и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

При сроке 23-25 недели гестации сохранялась умеренная и слабая цитоплазматическая экспрессия андрогенового рецептора в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и выраженная ядерная экспрессия в перитубулярных клетках. В эпителии канальцев экспрессия не наблюдалась.

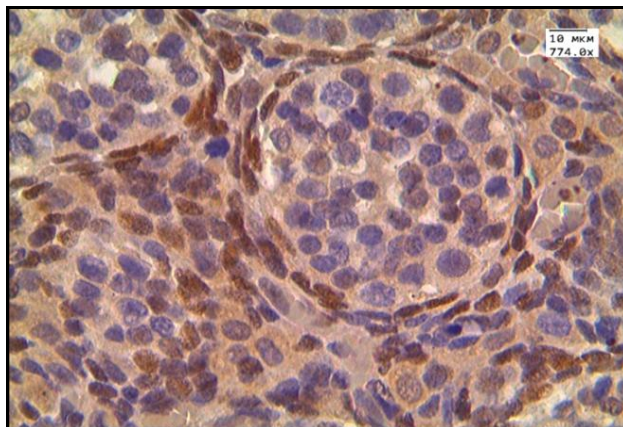


Рисунок 12 - Выраженная ядерная экспрессия андрогенового рецептора AR в перитубулярных клетках, умеренная и слабая в канальцах и строме яичек у плода 19-22 недели гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом AR и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

При сроке 26-29 и 30-40 недель наблюдалась умеренная и слабая цитоплазматическая экспрессия андрогенового рецептора в клетках Лейдига и в клетках сперматогенного эпителия.

Цитоплазматическая экспрессия фактора роста фибробластов FRF при острой гипоксии плода при сроке гестации 19-22 недели была умеренной в интерстициальных эндокриноцитах, слабой - в отдельных клетках сперматогенного эпителия (рисунок 13).

При сроке гестации 23-25 недель сохранялась умеренная цитоплазматическая экспрессия фактора роста фибробластов в интерстициальных эндокриноцитах, в клетках сперматогенного эпителия она была более выраженной, но количество экспрессирующих клеток уменьшилось, чем в предыдущие сроки гестации.

При сроке гестации 26-29 и 30-40 недель гестации сохранялась умеренная и слабая цитоплазматическая экспрессия фактора роста фибробластов в интерстициальных эндокриноцитах и в клетках сперматогенного эпителия. Индекс FRF колебался от 50 до 72% (медиана 65%).

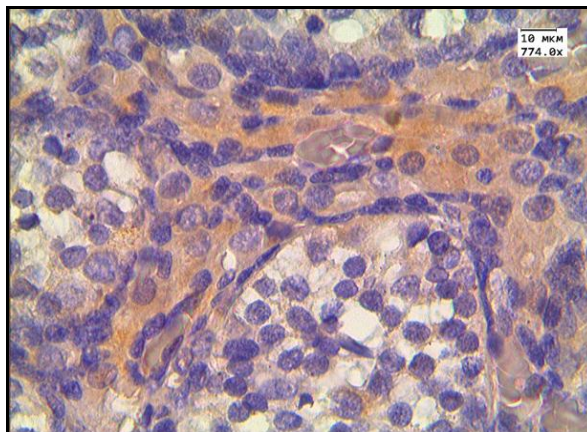


Рисунок 13. Умеренная экспрессия фактора роста фибробластов FRF в строме яичек у плода 19-22 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом FRF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774

Таким образом, при острой гипоксии плода пролиферативные процессы в тканях яичек наблюдались во все сроки гестации. При исследовании апоптотической активности наблюдалась умеренная и слабая экспрессия маркера апоптоза Bcl2 в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и перитубулярных миоидных клетках. В эпителиоцитах канальцев экспрессии маркера не наблюдалось. Экспрессия андрогенового рецептора была ядерной и сильновыраженной в перитубулярных миоидных клетках до 25 недели гестации, затем наблюдалось уменьшение экспрессии и она была преимущественно цитоплазматической. Фактор роста фибробластов имел цитоплазматическую экспрессию и увеличивался до 29 недели. После 30 недели гестации экспрессия фактора роста фибробластов практически отсутствовала. Экспрессия васкулоэндотелиального фактора VEGF с увеличением срока гестации уменьшалась.



## Глава 5. Морфологические изменения яичек плодов на фоне хронической внутриутробной гипоксии

### 5.1. Макроскопическая характеристика яичек

При вскрытии трупов плодов и новорожденных было установлено, что до 25 недели гестации гонады располагались в брюшной полости, с 26 недели отмечали расположение яичек в области внутреннего пахового кольца по ходу связки яичка (паховом канале), ближе к 40 неделе яички располагались в мошонке (рисунки 14,15).



Рисунок 14 - Брюшное расположение яичек у плода 22 недели гестации

Как и в группе плодов с острой гипоксией, при хронической гипоксии с увеличением срока гестации увеличивались размеры, объем и масса яичек. Причем сохранялась тенденция по преобладанию этих показателей с правой стороны, то есть у правого яичка (таблицы 11,12).

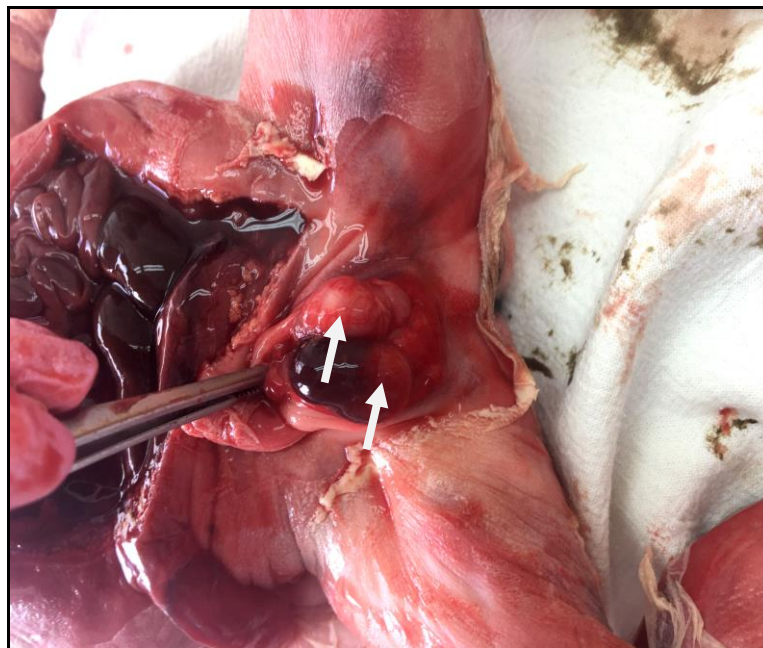


Рисунок 15 - Мошоночное расположение яичек у плода 36 недель гестации

Таблица 11 - Масса (мг) и объем (мм<sup>3</sup>) яичек при хронической гипоксии

Срок гестации, недели	Правое яичко		Левое яичко		Оба яичка	
	Масса Me [25;75]	Объем Me [25;75]	Масса Me [25;75]	Объем Me [25;75]	Масса Me [25;75]	Объем Me [25;75]
<b>19-22</b>	0,115 [0,10;0,14]	38 [25;54]	0,095 [0,08;0,12]	33 [18;39]	<b>0,105</b> <b>[0,09;0,145]</b>	<b>33</b> <b>[19;50]</b>
<b>23-25</b>	0,19 [0,15;0,22]	64 [53;70]	0,17 [0,14;0,19]	48 [42;64]	<b>0,17</b> <b>[0,15;0,20]</b>	<b>56</b> <b>[48;64]</b>
<b>26-29</b>	0,3 [0,26;0,32]	100 [70;124]	0,24 [0,23;0,26]	72 [59;84]	<b>0,27</b> <b>[0,24;0,30]</b>	<b>76</b> <b>[63;102]</b>
<b>30-40</b>	0,7 [0,52;0,93]	231 [106;310]	0,72 [0,56;0,89]	97 [55;199]	<b>0,67</b> <b>[0,52;0,9]</b>	<b>172</b> <b>[81;238]</b>

Таблица 12 - Длина (мм) и ширина(мм) яичек при хронической гипоксии

Срок гестации (недели)	Правое яичко		Левое яичко		Оба яичка	
	Длина Ме [25;75]	Ширина Ме [25;75]	Длина Ме [25;75]	Ширина Ме [25;75]	Длина Ме [25;75]	Ширина Ме [25;75]
19-22	6,0 [5,2;7,7]	3,5 [3,0;4,0]	5,5 [5,0;6,0]	3,0 [3,0;4,0]	<b>6,0</b> <b>[5,0;7,0]</b>	<b>3,5</b> <b>[3,0;4,0]</b>
23-25	8,0 [7,2;8,7]	4,0 [4,0;4,7]	7,0 [7,0;7,7]	4,0 [3,0;4,0]	<b>7,5</b> <b>[7,0;8,0]</b>	<b>4,0</b> <b>[3,2;4,5]</b>
26-29	10,0 [9,5;10,5]	5,0 [3,5;6,5]	9,0 [8,0;9,0]	4,0 [3,5;5,0]	<b>9,0</b> <b>[8,7;10,0]</b>	<b>4,0</b> <b>[3,7;6,0]</b>
30-40	11,0 [10,5;14,0]	7,0 [4,5;8,0]	9,5 [9,0;10,7]	4,5 [3,0;7,5]	<b>11,0</b> <b>[9,7;12,2]</b>	<b>6,5</b> <b>[3,7;8,0]</b>

## 5.2.Морфология яичек плодов при хронической гипоксии

В сроки 19-22 недели гестации наблюдалось компактное расположение канальцев и стромы. В некоторых случаях строма была отечна. Клетки Лейдига в большом количестве располагались в строме. Контуры отдельных канальцев были нечеткими. Клетки в просвете семенных канальцев располагались хаотично, просвета в канальцах не было, встречались единичные крупные клетки в канальцах с вакуолизированной цитоплазмой (рисунок 16).

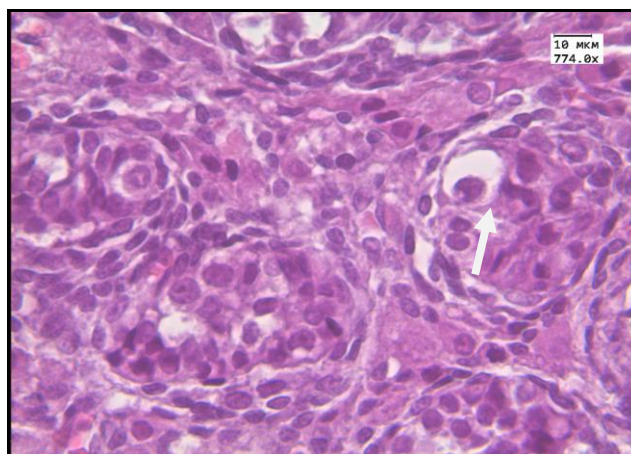


Рисунок 16 - Яичко плода 19-22 недель гестации. Канальцы плохо визуализируются, клетки с вакуолизированной цитоплазмой (стрелка). Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

Морфометрическое исследование показало, что в одном поле зрения насчитывалось в среднем около 15 канальцев, в просвете которых располагалось от 33 до 41 клетки. Диаметр канальцев составлял 0,048 мм, а общая их площадь в среднем равнялась 0,0089 мкм<sup>2</sup>. Следует отметить, что площадь стромы преобладала и составляла в среднем 0,012 мкм<sup>2</sup> (таблица13). ПСИ был ниже, чем при острой гипоксии на этом же сроке гестации, и составлял 0,75.

В 23-25 недель гестации был хорошо выражен стромальный компонент, в некоторых случаях встречался отек. Сосуды были полнокровные. В интерстиции определялось большое количество интерстициальных эндокриноцитов, располагавшихся полями. Базальная мембрана некоторых канальцев была нечеткой, просветы в канальцах отсутствовали, крупные клетки встречались в небольшом количестве (рисунок17).

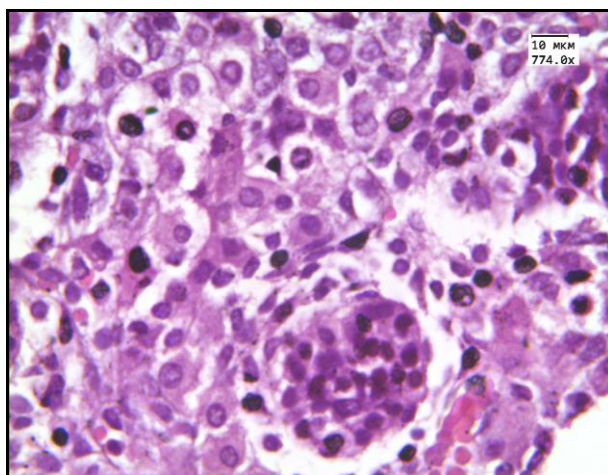


Рисунок 17 - Яичко плода 23-25 недель гестации. Большое количество клеток Лейдига в интерстиции. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

При морфометрическом исследовании было установлено, что сроки гестации 23-25 недель количество канальцев и количество клеток в канальцах практически не менялось по сравнению с предыдущим периодом. Диаметр канальцев немного увеличивался до 0,053 мкм (в сроки 19-22 недели 0,048), однако площадь канальцев оставалась прежней. Отмечалось некоторое

увеличение интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига) с 9 до 11 в поле зрения (таблица 13).

Таблица 13 - Морфометрические показатели ткани яичек при хронической гипоксии

Показатель	Срок гестации, недели. Медиана [25;75]			
	19-22	23-25	26-29	30-40
Количество канальцев в п/зр	15 [13;18]	15 [14;19]	17 [15;20]	15 [13;16]
Количество клеток в канальцах	37 [33;40]	35 [29;47]	26 [23;33]	33 [31;37]
Количество сосудов	6 [3;8]	11 [7;22]	11 [7;14]	22 [15;27]
Количество интерстициальных эндокриноцитов	9 [5;10]	11 [9;14]	12 [10;13]	4 [2;7]
Диаметр канальцев, мм	0,048 [0,040;0,052]	0,053 [0,048;0,063]	0,055 [0,05;0,06]	0,064 [0,055;0,068]
Высота клеток в канальцах, мм	0,007 [0,006; 0,008]	0,007 [0,006;0,007]	0,008 [0,007;0,008]	0,007 [0,007; 0,008]
Площадь канальцев, мм <sup>2</sup>	0,0089 [0,0073; 0,0101]	0,009 [0,0069;0,0105]	0,0073 [0,0059;0,0085]	0,0092 [0,0083;0,01 1]
Площадь стромы, мм <sup>2</sup>	0,0121 [0,0110; 0,0137]	0,012 [0,0105;0,0141]	0,0137 [0,0125; 0,0152]	0,0118 [0,0100;0,01 26]

В 26-29 недель гестации в яичках был хорошо выражен стромальный компонент. В строме располагались мелкие полнокровные сосуды и большое количество клеток Лейдига, иногда наблюдался отек. В некоторых канальцах появлялся просвет, в остальных – клетки располагались хаотично (рисунок 18). Базальная мембрана в части канальцев плохо визуализировалась, отмечалась дистрофия эпителия. При морфометрическом исследовании количество канальцев в поле зрения увеличивалось до 17 в поле зрения (в сроки 19-22



недели гестации 15 в поле зрения), диаметр канальцев также увеличивался с 0,048 до 0,055 мкм.

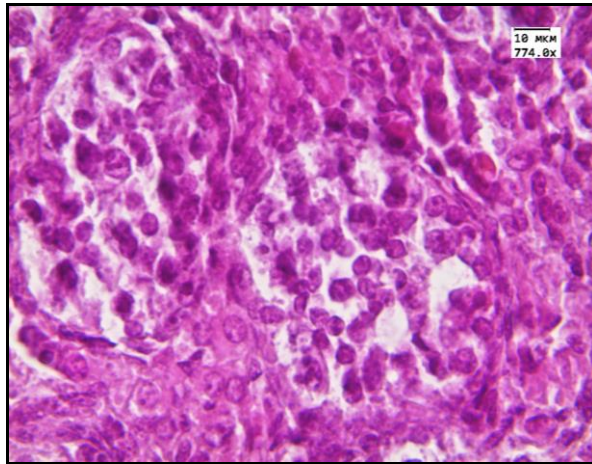


Рисунок 18 - Яичко плода 26-29 недель гестации. Клетки располагаются хаотично, просвета в канальцах нет. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

. Однако количество клеток в канальцах уменьшалось и в среднем составляло 26 (в период 19-22 недели гестации – 37). Отмечалось уменьшение площади канальцев с 0,0090 до 0,0073 мкм<sup>2</sup> с соответствующим увеличением площади стромы до 0,0137 мкм<sup>2</sup> (в предыдущие периоды средняя площадь стромы была равна 0,0120 мкм<sup>2</sup> – таблица 10). ПСИ уменьшался с 0,75 до 0,53 на данном сроке.

В 30-40 недель гестации в яичках продолжала доминировать межканальцевая соединительная ткань. Создавалось впечатление, что канальцы сдавливались стромой и просвета в них не наблюдалось (рисунок 19). Сперматогенный эпителий был представлен мелкими и крупными клетками со светлыми ядрами, располагавшимися хаотично.

При морфометрическом исследовании отмечалось уменьшение количества канальцев в поле зрения с 17 до 15. Среднее количество клеток в канальцах было ниже, чем в сроки 19-22 недели (медиана 33 и 37 соответственно). Диаметр канальцев увеличивался с 0,055 до 0,064 мкм. Площадь канальцев была такой

же, как в период 19-25 недель гестации и составляла 0,0092 мкм<sup>2</sup>. Площадь стромы была равна 0,0118 мкм<sup>2</sup>, а значение ПСИ приближалось к значениям на более ранних сроках гестации и составляло 0,78 (таблица 13).

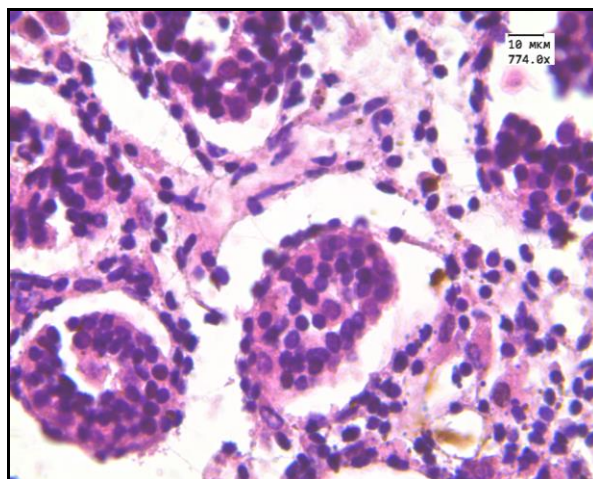


Рисунок 19 - Яичко плода 30-40 недель гестации. Атрофия канальцев, отсутствие просвета в них, перитубулярный отек. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув. 774.

При окраске препаратов пикрофуксином по Ван-Гизон отмечалась положительная реакция на соединительную ткань интерстиция яичка, выраженное окрашивание капсулы, а также интерстиция придатка семенника (рисунки 20,21).

Таким образом, на всех сроках гестации при хронической гипоксии масса и линейные размеры были меньше, чем при острой гипоксии. В отличие от острой гипоксии, на фоне хронической наблюдались следующие изменения: извитые канальцы имели нечеткие контуры, базальная мембрана в части канальцев плохо визуализировалась, отмечалась дистрофия эпителия, на всех сроках гестации превалировал стромальный компонент, в интерстиции определялось большое количество клеток Лейдига и сосудов.

Количество канальцев практически не менялось, диаметр канальцев хоть и увеличивался, однако был ниже, чем в группе острой гипоксии, количество клеток в канальцах уменьшалось. Паренхиматозно-стромальный индекс

практически на всех сроках гестации был ниже, чем в группе плодов с острой гипоксией.

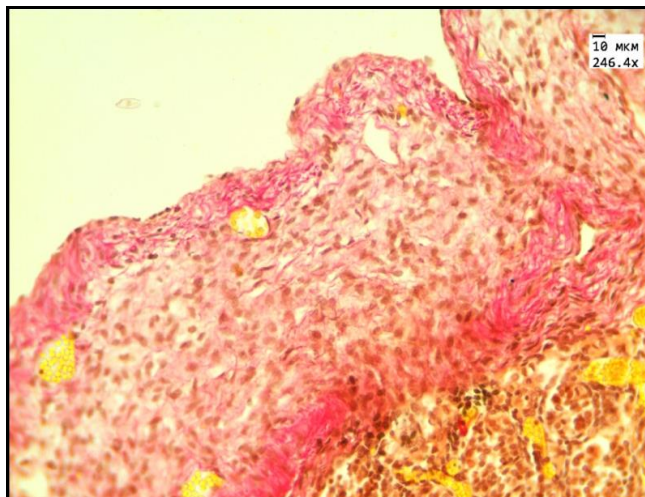


Рисунок 20 - Яичко плода 26-29 недель гестации. Выраженный фиброз соединительнотканной капсулы. Окр. Ван-Гизон. Ув.246.

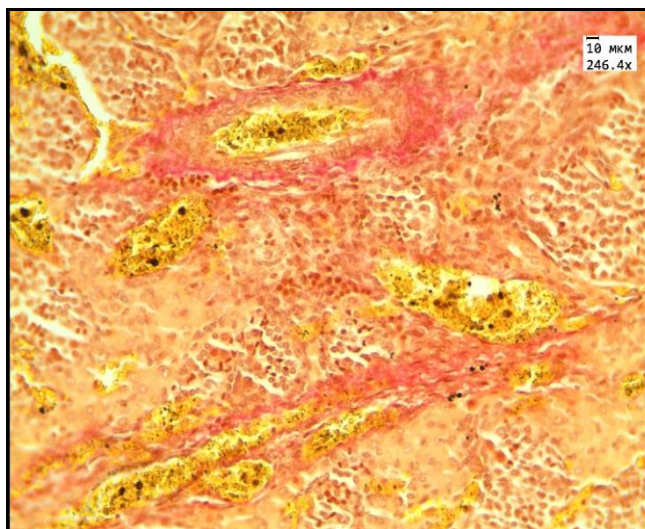


Рисунок 21 - Яичко плода 23-25 недель гестации. Полнокровные сосуды, периваскулярный фиброз. Окр. Ван-Гизон. Ув.246.



### 5.3. Иммуногистохимические особенности экспрессии маркеров пролиферации, апоптоза, фактора роста эндотелия сосудов и рецепторов эстрогена и андрогена в яичках плода на фоне хронической гипоксии

При сроке гестации 19-22 недели экспрессия маркера пролиферации Ki67 была слабой и обнаруживалась лишь в отдельных клетках стромы и гоноцитах, либо отсутствовала в поле зрения.

При сроке гестации 23-25 недель отмечалась слабая экспрессия в единичных клетках канальцев и строме (рисунок 22). В отдельных полях экспрессия не наблюдалась. Индекс пролиферации колебался от 0 до 5%.

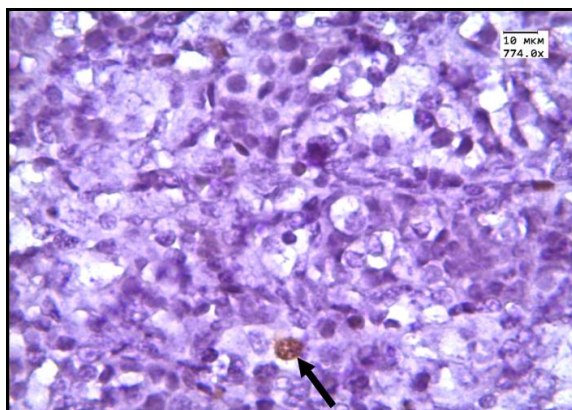


Рисунок 22 - Слабая экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в эпителии канальцев (черная стрелка) яичек у плода 23-25 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki-67 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

При сроке гестации 26-29 недель медиана индекса пролиферации увеличилась до 27%. Наблюдалась выраженная экспрессия в отдельных клетках сперматогенного эпителия.

При сроке 30-40 недель гестации в одних случаях отмечалась выраженная и умеренная экспрессия в единичных клетках сперматогенного эпителия, в строме. В других случаях экспрессия была слабо выражена, в отдельных полях зрения реакции вообще не обнаруживалось. Индекс пролиферации колебался от 0 до 29%.

Таблица 14 - Зависимость экспрессии маркера пролиферации Ki-67 от срока гестации в группах с острой и хронической гипоксией плода

Медиана [25;75]	Острая гипоксия				Хроническая гипоксия			
	19-22	23-25	26-29	30-40	19-22	23-25	26-29	30-40
	12 [10;19]	12 [9;13]	32 [29;40]	30 [27;34]	1 [0;2]	2 [1;3]	27 [19;35]	11 [2;17]

Иммуногистохимическая картина маркера апоптоза при хронической гипоксии имела свои особенности. Экспрессия маркера апоптоза Bcl 2 была умеренной и слабой и наблюдалась не только в интерстициальных клетках Лейдига и миоидных клетках, но и в клетках сперматогенного эпителия. Медиана индекса маркера апоптоза при сроке гестации 19-22 недели составила 21 %, что практически в 2 раза больше данного показателя в эти же сроки при острой гипоксии, в остальные сроки гестации экспрессия постепенно уменьшалась (таблица 15, рисунки 23-24).

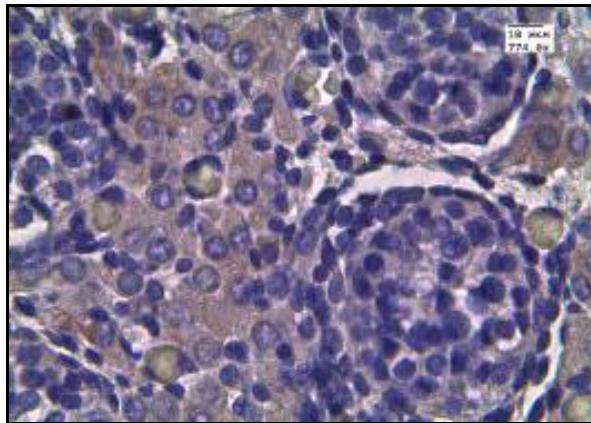


Рисунок 23 - Умеренная экспрессия маркера апоптоза Bcl2 в клетках Лейдига в яичках плода 19-22 недель гестации при хронической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция с антителом Bcl2 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

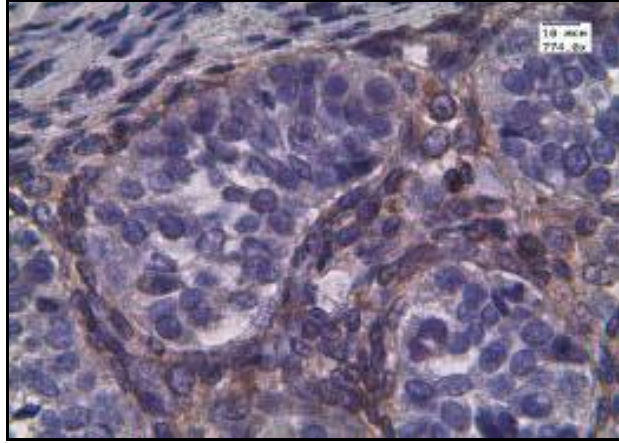


Рисунок 24 - Умеренная экспрессия маркера апоптоза Bcl 2 в клетках Лейдига и перитубулярных миоидных клетках в яичках плода 26-29 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом Bcl2 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Таблица 15 - Зависимость экспрессии маркера апоптоза от срока гестации по группам

Индекс апоптоза %	Острая гипоксия				Хроническая гипоксия			
	19-22	23-25	26-29	30-40	19-22	23-25	26-29	30-40
Медиана [25;75]	11 [9;12]	22 [19;24]	11 [9;15]	7 [5;10]	21 [17;32]	15 [12;18]	12 [9;13]	11 [8;13]

Экспрессия эстрогенового рецептора при хронической гипоксии на сроке 19-22 недели была выраженной и наблюдалась в клетках Лейдига и клетках сперматогенного эпителия. Индекс ER колебался от 85 до 100% (таблица 16).

В остальные сроки выраженная экспрессия в канальцах сохранялась, в интерстиции была умеренной (рисунок 25).

Экспрессия андрогенового рецептора AR при хронической гипоксии была преимущественно цитоплазматической, умеренной и слабой во все сроки гестации и наблюдалась как в строме, так и в паренхиме ткани яичка.

Таблица 16 - Зависимость экспрессии маркера ER от срока гестации по группам

Индекс ER % Медиана [25;75]	Острая гипоксия				Хроническая гипоксия			
	19-22	23-25	26-29	30-40	19-22	23-25	26-29	30-40
	16 [11;25]	15 [14;22]	1 [0;2]	4 [1;6]	95 [87;99]	80 [80;90]	94 [91;96]	98 [95;100]

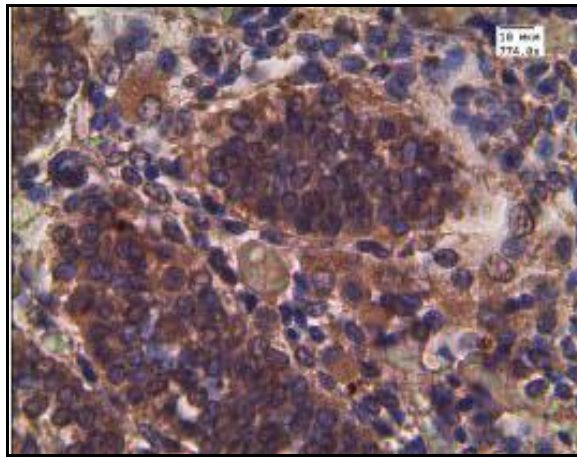


Рисунок 25. Выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER в яичке плода 26-29 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом ER и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

В сроки 26-29 недель и 30-40 недель гестации в отдельных полях зрения появлялась ядерная экспрессия в перитубулярных миоидных клетках, а также клетках сперматогенного эпителия (рисунки 26-27, таблица 17).

Таблица 17 - Зависимость экспрессии маркера AR от срока гестации по группам

Индекс AR % Медиана [25;75]	Острая гипоксия				Хроническая гипоксия			
	19-22	23-25	26-29	30-40	19-22	23-25	26-29	30-40
	90 [85;95]	85 [80;92]	50 [45;60]	43 [40;48]	70 [50;70]	60 [50;71]	40 [35;42]	65 [55;72]



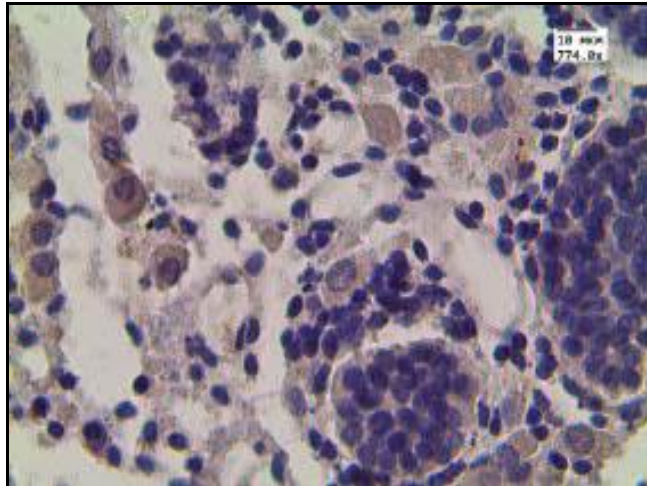


Рисунок 26 - Слабая экспрессия андрогенового рецептора AR в клетках Лейдига яичек плода 30-40 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом AR и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

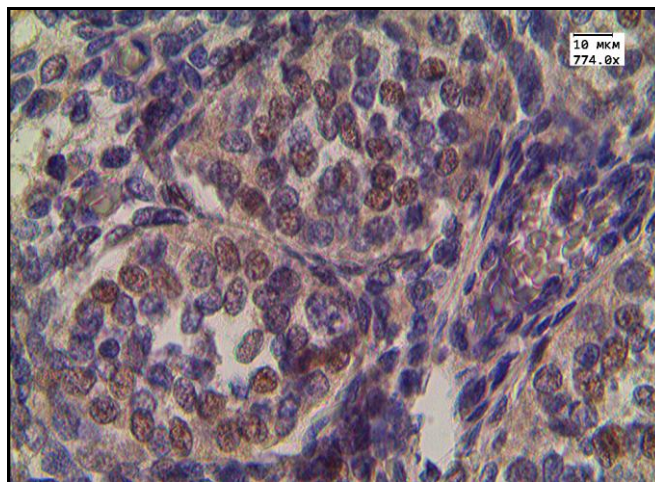


Рисунок 27 - Умеренная ядерная экспрессия андрогенового рецептора AR в канальцах яичек плода 30-40 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом AR и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Цитоплазматическая экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF в тканях яичек плода при хронической гипоксии была выраженной в клетках сперматогенного эпителия во все периоды гестации. В интерстициальных эндокриноцитах отмечалась умеренная или слабая экспрессия VEGF, на поздних сроках (30-40 недель) в клетках Лейдига отмечалась выраженная экспрессия (рисунки 28-29). То есть с увеличением срока гестации степень выраженности

экспрессии и количество положительно экспрессирующих клеток увеличивалось (таблица 18).

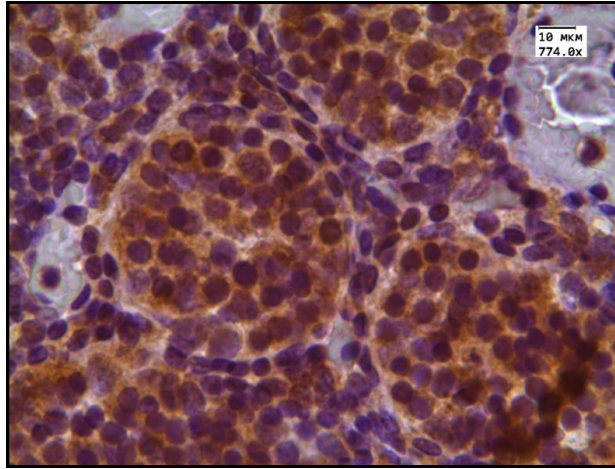


Рисунок 28 - Умеренная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF в канальцах, в строме яичек плода 26-29 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом VEGF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

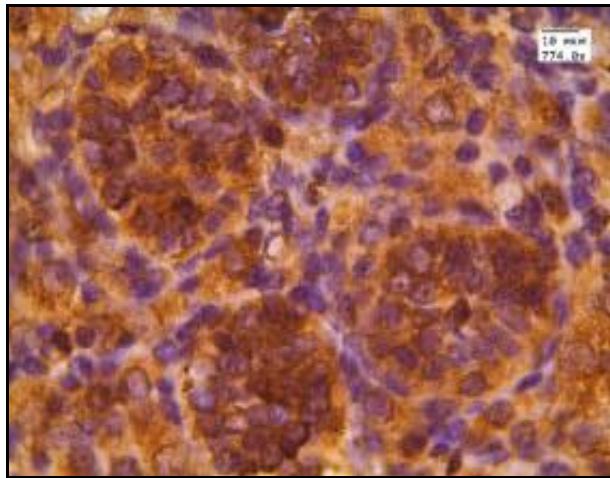


Рисунок 29 - Выраженная диффузная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF тканей яичек плода 30-40 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом VEGF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Таблица 18 - Зависимость экспрессии маркера VEGF от срока гестации по группам

Индекс VEGF %	Острая гипоксия				Хроническая гипоксия			
	19-22	23-25	26-29	30-40	19-22	23-25	26-29	30-40
Медиана	95	70	75	71	65	87,5	85	92
[25;75]	[90;100]	[61;75]	[68;80]	[66;74]	[60;70]	[80;98]	[75;90]	[90;95]

Цитоплазматическая экспрессия фактора роста фибробластов FRF при хронической гипоксии плода при сроке гестации 19-22 недели была умеренной в интерстициальных эндокриноцитах и в отдельных клетках сперматогенного эпителия (рисунок 30).

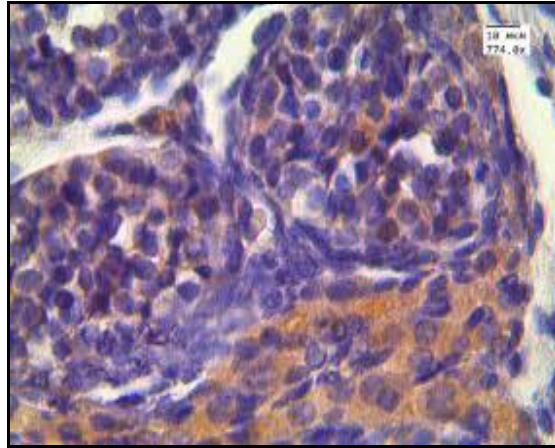


Рисунок 30 - Умеренная экспрессия фактора роста фибробластов FRF в строме, в отдельных клетках сперматогенного эпителия яичек плода 19-22 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом FRF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774

При сроке гестации 23-25 недель отмечалась слабая цитоплазматическая экспрессия фактора роста фибробластов в интерстициальных эндокриноцитах, а также в единичных клетках сперматогенного эпителия.

При сроке гестации 26-29 недель наблюдалась умеренная и слабая цитоплазматическая экспрессия фактора роста фибробластов в интерстициальных эндокриноцитах и в клетках сперматогенного эпителия (рисунок 31, таблица 19). Индекс FRF колебался от 60 до 85%. При сроке 30-40 недель экспрессии не наблюдалось.

Таблица 19 - Зависимость экспрессии маркера FGF от срока гестации

Индекс FGF % Медиана [25;75]	Острая гипоксия				Хроническая гипоксия			
	19-22	23-25	26-29	30-40	19-22	23-25	26-29	30-40
	36 [25;50]	60 [47;67]	65 [60;70]	11 [9;15]	45 [35;50]	50 [38;61]	75 [70;80]	7 [5;9]

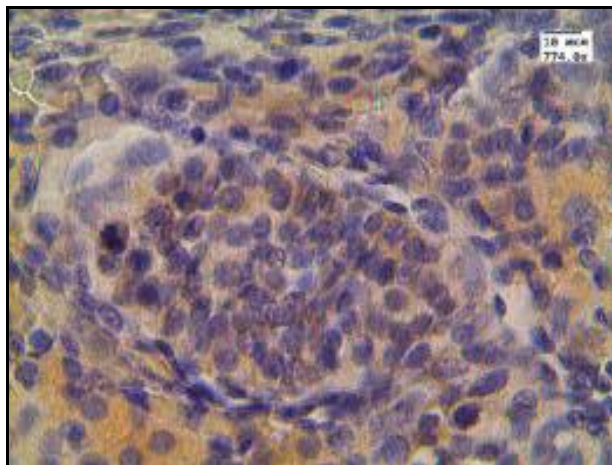


Рисунок 31 - Умеренная экспрессия фактора роста фибробластов FRF в строме и канальцах яичек плода 26-29 недель гестации. Иммуногистохимическая реакция с антителом FRF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774

Таким образом, в условиях хронической гипоксии во все сроки гестации экспрессия маркера пролиферации наблюдалась в единичных клетках сперматогенного эпителия, в сроки 26-29 недель гестации показатель индекса пролиферации был максимальным, но все же ниже, чем в группе острой гипоксии. Экспрессия маркера апоптоза Bcl 2 наблюдалась не только в интерстициальных клетках Лейдига и миоидных клетках, как при острой гипоксии, но и в клетках сперматогенного эпителия. Во все периоды гестации превалировала экспрессия маркера эстрагенового рецептора. Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов с увеличением срока гестации увеличивалась, а маркера роста фибробластов повышалась до 29 недели.



## Глава 6. Морфометрическая и иммуногистохимическая характеристика изменений потомства крыс при экспериментальном моделировании состояния внутриутробной гипоксии плода

### 6.1. Результаты ультразвукового исследования плаценты и доплерографии сосудов матки беременных крыс

В контрольной группе плацента крыс выглядела однородной, имела гомогенный вид и одинаковую плотность, медиана ее толщины составила 0,41см.

При измерении кровотока медианы индекса резистентности (ИР) и систоло-диастолического отношения (СДО) составили 0,38 и 1,62 соответственно, пиковая систолическая скорость артериального кровотока (PCV), конечная диастолическая скорость (EDV) 18,36 и 11,5 соответственно (рисунок 32).

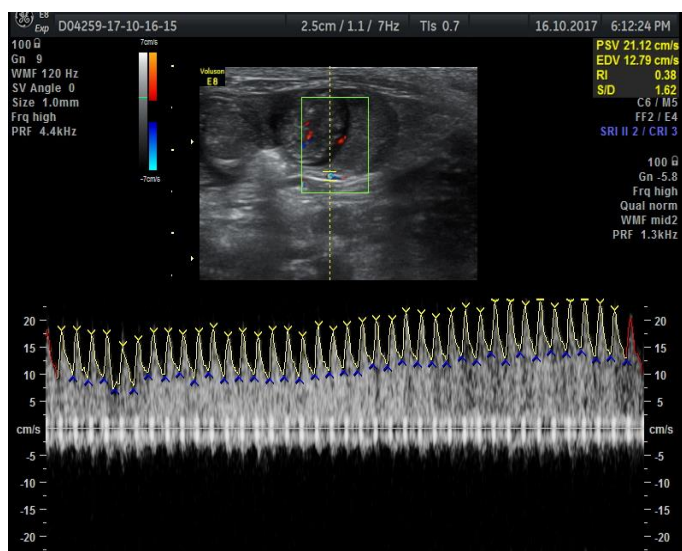


Рисунок 32 - Кровоток в маточной артерии у самки из контрольной группы

Изменения в опытных группах при гипоксии независимо от механизма ее развития были идентичными.

Структура плаценты была неоднородной, выявлялись эхонегативные участки. Медиана ее толщины составила 0,28 см. У 4 из 10 самок (в 40% случаев) визуализировались пустые плодные яйца (рисунок 33).

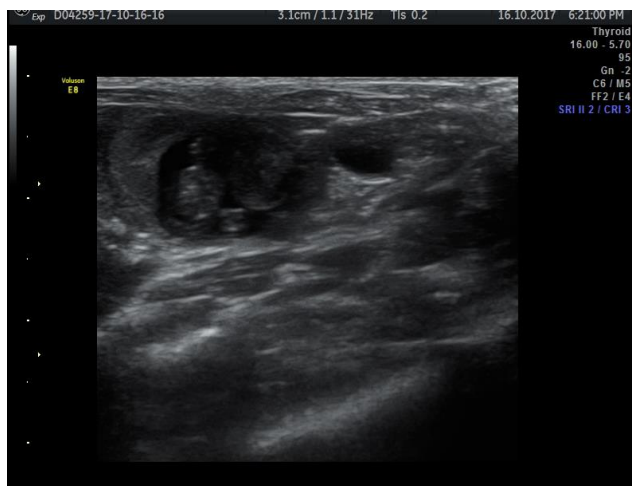


Рисунок 33 - Пустое плодное яйцо в матке у самки из опытной группы

Анализ гемодинамических показателей показал повышение индексов периферического сопротивления (ИР и СДО) (Ме ИР - 0,575; Ме СДО – 2.36, таблица 20) практически в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Это указывает на уменьшение кровотока и повышение периферического сопротивления сосудов матки (рисунок 34).

Также в опытных группах было зарегистрировано уменьшение абсолютных величин скоростей артериального кровотока (PCV и EDV) по сравнению с контрольной группой (таблица 20).

Таблица 20 - Характеристика артериального кровотока в опытной и контрольной группах накануне родов

Показатель	Гипоксия Ме [25;75]	Контроль Ме [25;75]
PCV	12,43 [11,18;13,18] *	18,36 [18,15;19,74] *
EDV	5,22 [4,79;5,61] *	11,5 [11,16;12,16] *
RI (ИР)	0,575 [0,55;0,60] *	0,38 [0,38;0,39] *
S\D (СДО)	2,36 [2,24;2,50] *	1,62 [1,61;1,64] *

Примечание: различия статистически значимы: \* -  $p < 0,05$

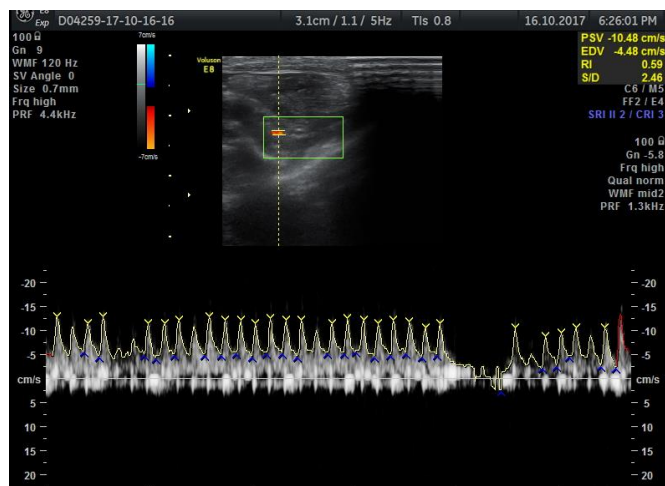


Рисунок 34. Кровоток в маточной артерии у самки из опытной группы

## 6.2. Морфологическая и морфометрическая характеристика тканей яичек новорожденных крысят

На первом этапе работы оценивали биологические показатели экспериментальных и контрольной групп по массе, полу и количеству новорожденных крысят.

Количество новорожденных крысят в контрольной группе составило 35, в первой опытной группе (нормобарическая гипоксия) – 27, во второй опытной группе (гемическая гипоксия) – 29.

Масса тела у потомства в контрольной группе колебалась от 4,65 до 6,93г (медиана 5,9 г), в первой опытной группе от 5,21 до 6,7 г (медиана 5,8 г), во второй опытной группе от 4,52 г до 8,3 г (медиана 5,62 г).

Сравнительный анализ пометов по полу показал преобладание женских особей у опытных групп по сравнению с контролем. Так, в контрольной группе наблюдалось примерно равное соотношение особей мужского и женского пола (18 мужской пол и 17 женский), в группе с нормобарической гипоксией из 27 новорожденных в 11 случаях наблюдали мужской пол, в 16 - женский, в группе с гемической гипоксией 10 крысят имели мужской пол, 19 - женский.

При обзорной световой микроскопии тканей яичек контрольной группы снаружи определялась толстая соединительнотканная оболочка. Семенные каналцы были овальной и округлой формы (рисунок 35). Просвет в семенных каналцах отсутствовал, клетки располагались беспорядочно. Сперматогенный эпителий был представлен sustentocитами и половыми клетками. Выявлялись крупные клетки с большим ядром – гоноциты (Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., 2020). В интерстиции располагалась нежная соединительная ткань. Местами между каналцами наблюдалась разреженность стромы, обусловленная отеком основного вещества.

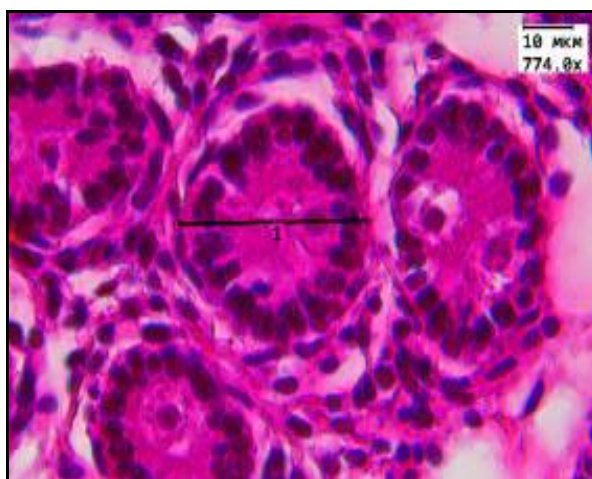


Рисунок 35 - Новорожденные крысы контрольной группы. Компактное расположение каналцев в яичке. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

При морфометрическом исследовании яичек контрольной группы диаметр каналцев варьировал от 0,04 до 0,06 мкм (медиана 0,05 мкм), количество каналцев - от 2 до 6 в поле зрения (медиана 4), количество клеток в каналцах от 18 до 36 в поле зрения (медиана 23), количество сосудов колебалось от 0 до 6 (медиана 2), площадь каналцев находилась в пределах от 0,0110 до 0,0130 мкм<sup>2</sup> (медиана 0,0120 мкм<sup>2</sup>), площадь стромы от 0,0071 до 0,0100 мкм<sup>2</sup> (медиана 0,0090 мкм<sup>2</sup>). ПСИ составил 1,3.

При обзорной световой микроскопии яичек первой опытной группы (гипоксическая гипоксия) извитые семенные каналцы также были овальной и

округлой формы. Клетки в канальцах располагались беспорядочно (рисунок 36), некоторые из них были вакуолизированы. Интерстиций был образован нежной соединительной тканью с явлениями перитубулярного отека и очагового фиброза.

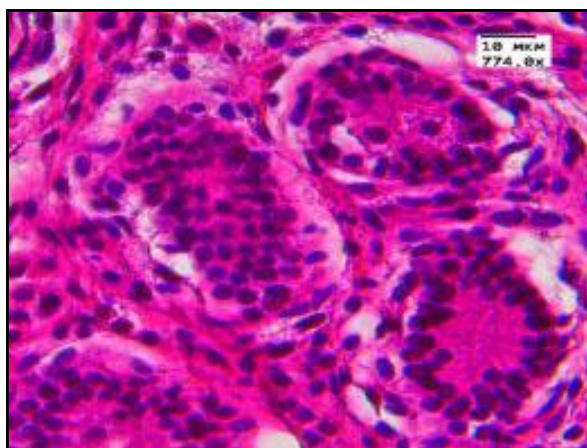


Рисунок 36 - Новорожденные крысяты опытной группы (гипоксическая гипоксия). Хаотичное расположение клеток в канальцах яичка. Перитубулярный фиброз. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

При морфометрическом исследовании яичек крысят первой опытной группы диаметр канальцев был немного меньше, чем в контрольной группе (медиана 0,043 мкм), количество канальцев и клеток в них менялось незначительно (медиана 3 и 23 соответственно), количество сосудов увеличивалось по сравнению с контролем (медиана 4), площадь канальцев с площадью стромы находилась примерно в равных соотношениях (медиана 0,0111 и 0,0105 соответственно, таблица 21). ПСИ составил 1,05.

При микроскопии яичек второй опытной группы (гемическая гипоксия) диаметр канальцев был уменьшен практически в 2 раза по сравнению с контролем и в среднем составил 0,026 мкм, количество канальцев и клеток в них практически не менялось, базальная мембрана отдельных канальцев была фрагментирована, визуализировалась нечетко. Отмечался выраженный отек стромы (рисунок 37). В отдельных полях зрения семенные каналцы

отсутствовали и при морфометрическом исследовании площадь стромы превалировала над паренхиматозным компонентом (медиана 0,0145 и 0,0065 мкм<sup>2</sup> соответственно). ПСИ составил 0,44 (таблица 21).

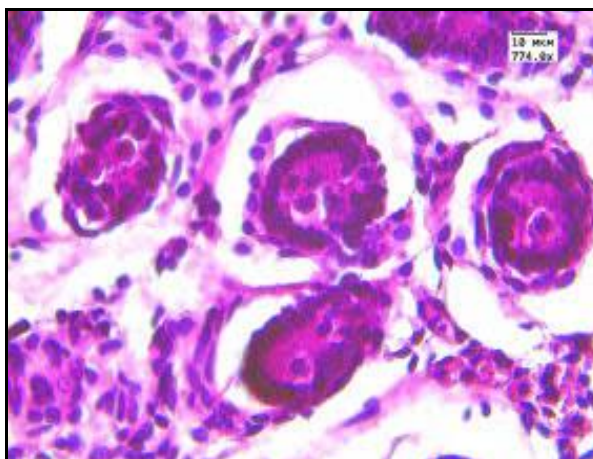


Рисунок 37 - Новорожденные крысята опытной группы (гемическая гипоксия). Выраженный отек стромы яичка. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.774.

При попарном сравнении между группами были выявлены значимые отличия в 1-й и 3-й группах по таким признакам, как площадь канальцев и стромы, количество семенных канальцев в поле зрения. При сравнении гемической гипоксии с контролем были выявлены значимые отличия по параметрам: количество, диаметр и площадь канальцев, площадь интерстиция, количество сосудов, количество интерстициальных эндокриноцитов.

Таблица 21 - Показатели гистоструктуры яичек новорожденных крысят

Количественные характеристики (в п/зр при увеличении 774)	1-я группа (гипоксическая гипоксия) Me [25;75]	2-я группа (гемическая гипоксия) Me [25;75]	3-я группа (контрольная) Me [25;75]	P
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Диаметр канальцев, мкм	0,043 [0,035;0,046]	0,026 [0,025;0,030]	0,050 [0,046;0,053]	0.186* <0.001**
Количество канальцев	3 [2;3]	5 [4;6]	4 [3;5]	<0.001* 0.003**

## Продолжение таблицы 21

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Количество клеток в канальцах	21 [19;27]	20 [17;26]	23 [19;28]	0.03* 0.276**
Количество сосудов	4 [3;4]	1 [0;1]	2 [1;3]	0.016* 0.003**
Количество клеток Лейдига	13[11;20]	8[6;9]	11[9;17]	0.221* 0.225**
Площадь канальцев, мкм <sup>2</sup>	0,0111 [0,0099;0,0116]	0,0065 [0,006;0,0071]	0,0120 [0,0110;0,0130]	0.049* <0.001**
Площадь стромы, мкм <sup>2</sup>	0,0105 [0,0100;0,0313]	0,0145 [0,0139;0,0150]	0,0090 [0,0071;0,0100]	0.009* <0.001**

Примечание: P\* – статистические различия между контрольной группой и группой гипоксической гипоксии; P\*\* – статистические различия между контрольной группой и группой гемической гипоксии.

### **6.3. Иммуногистохимическое исследование тканей яичек новорожденных крысят**

В контрольной группе экспрессия маркера пролиферации Ki 67 была умеренно и сильно выраженной и наблюдалась преимущественно в клетках сперматогенного эпителия. Индекс маркера пролиферации варьировал в пределах от 75 до 82 %.

В опытных группах отмечалась умеренная и слабая экспрессия маркера пролиферации в клетках сперматогенного эпителия и в клетках Лейдига в строме. В группе гипоксической гипоксии индекс маркера пролиферации менялся от 54 до 77%, а в гемической – от 45 до 63% (рисунок 38).



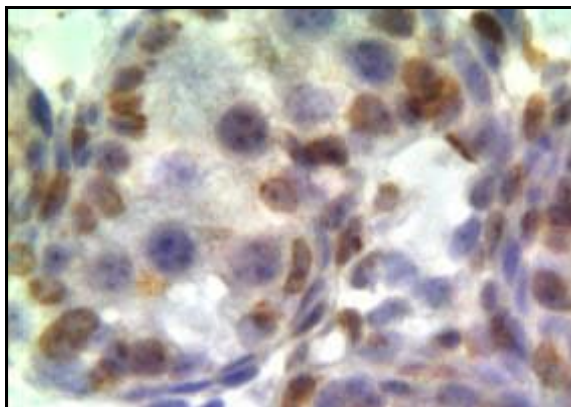


Рисунок 38. Умеренная экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в отдельных клетках сперматогенного эпителия яичек крыс при гипоксической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki-67 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

С целью выявления апоптотической активности соматических и половых клеток определяли уровни экспрессии регуляторов апоптоза – p53 и Вах.

В ткани яичек контрольной группы наблюдалась слабая экспрессия маркера апоптоза Вах в клетках сперматогенного эпителия, а также и в строме. Индекс маркера апоптоза колебался в пределах от 21 до 43%. Экспрессия маркера p53 была слабой в клетках сперматогенного эпителия – гоноцитах, а индекс маркера p53 составлял от 8 до 25%.

В опытных группах отмечалась умеренная экспрессия маркера апоптоза Вах в извитых канальцах, слабая в строме. Экспрессия регулятора апоптоза p53 была слабой и наблюдалась в клетках Лейдига и единичных клетках сперматогенного эпителия. В группе гипоксической гипоксии индекс маркера апоптоза Вах варьировал от 50 до 66 %, индекс маркера p 53 - от 18 до 27%. В группе гемической гипоксии индекс маркера апоптоза Вах колебался в пределах от 53 до 68 %, индекс маркера p 53 – от 22 до 30 % (таблица 22, рисунок 39).



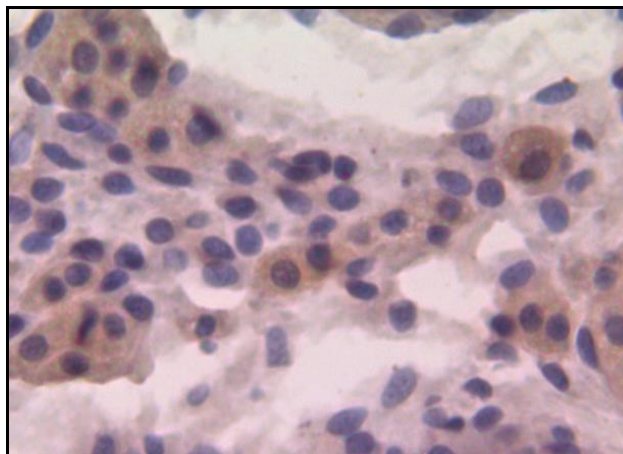


Рисунок 39. Слабая экспрессия маркера p53 в клетках Лейдига яичек крыс при гемической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция с антителом p53 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Jiang X., (2004); Reyes J.G. (2012) считают, что фактор роста фибробластов активизирует пролиферацию sustentоцитов и половых клеток. Также авторы заявляют, что данный фактор присутствует во всех клеточных популяциях в яичке и ответственен за выработку тестостерона.

Экспрессия фактора роста фибробластов в тканях яичек контрольной группы была умеренно выраженной и наблюдалась во всех клетках сперматогенного эпителия, а также в строме. Индекс фактора роста фибробластов менялся от 32 до 41%.

В опытных группах экспрессия фактора роста фибробластов не наблюдалась, или была слабо выраженной. В клетках Лейдига наблюдалась умеренная экспрессия. Индекс экспрессии в обеих группах был почти одинаковый и составлял от 0 до 15% (таблица 22, рисунок 40).

При сравнении данных в группах были выявлены значимые отличия в опытных и контрольной группах в экспрессии следующих маркеров: Ki-67, Вах, FGF ( $\phi$  критерий  $\geq 2,31$ ; таблица 22).

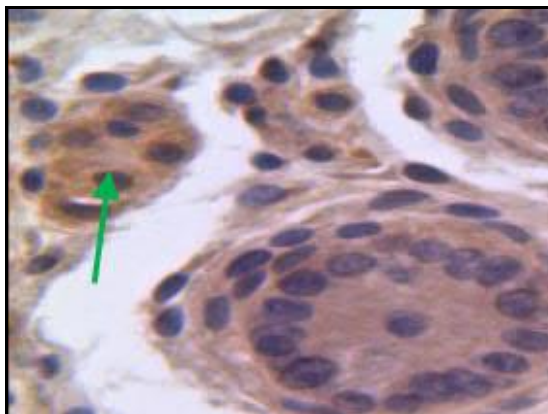


Рисунок 40. Слабая экспрессия фактора роста фибробластов FGF в клетках Лейдига яичек крыс при гипоксической гипоксии (стрелка). Иммуногистохимическая реакция с антителом FGF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

Таблица 22 - Экспрессия маркера пролиферации, апоптоза, фактора роста фибробластов в ткани яичек новорожденных крысят

Маркер	Гипоксия Me [25;75]		Контроль Me [25;75]	φ критерий
	Гипоксическая	Гемическая		
Маркер пролиферации Ki-67	62 [54;77]	55 [45;63]	78,5 [75;82]	2,489* 3,493**
Маркер апоптоза Вах	64 [50;66]	66 [53;68]	23,5 [21;43]	6,046* 6,343**
Маркер апоптоза p53	23 [18;27]	28 [22;30]	19,5 [10;24]	0,693* 1,506**
Фактор роста фибробластов FGF	10 [0;15]	8 [0;10]	34 [32;41]	4,25* 4,745**

Примечание: \*φ критерий при сравнении нормобарической гипоксии с контрольной группой

\*\* φ критерий при сравнении гемической гипоксии с контрольной группой

Таким образом, при ультразвуковом исследовании с доплерографией в опытных группах наблюдались все признаки плацентарной недостаточности. При оценке биологических показателей новорожденных крысят было выявлено,

что количество новорожденных в опытных группах было ниже, количество особей мужского пола также ниже, чем в контрольной. При гистологическом исследовании в опытных группах каналцы были уменьшены за счет фиброза и перитубулярного отека, базальная мембрана части каналцев была фрагментирована, нечеткая, диаметр и площадь каналцев были уменьшены по сравнению с контрольной группой. При иммуногистохимическом исследовании в опытных группах отмечалась слабая экспрессия маркера пролиферации, умеренная экспрессия маркеров апоптоза, экспрессия фактора роста фибробластов была слабовыраженной.

#### **6.4. Морфологическая характеристика яичек половозрелых самцов**

Одним из ведущих показателей морфофункциональной зрелости яичек считается ее абсолютный и относительный вес (Клевезаль, Г.А. 2007).

В некоторых работах (Мухачева, С.В., 2006) внимание уделяется такому показателю, как весовой (генеративный) индекс, который представляет собой отношение массы органа к массе тела.

В контрольной группе абсолютная масса семенников составляла от 1,55 до 1,85 г (медиана 1,66 г), весовой индекс был равен 0,94 %. В опытных группах наблюдалась следующая ситуация: в группе гипоксической гипоксии масса семенников колебалась от 1,50 до 1,70 г (медиана 1,6 г), генеративный индекс – 0,9%, в группе гемической гипоксии масса яичек варьировала от 1,5 до 1,74 г (медиана 1,57 г), весовой индекс – 1,2% (таблица 23).

По результатам непараметрического критерия Манна – Уитни статистически значимые отличия при сравнении опытных групп с контрольной наблюдали по таким параметрам, как масса крыс и весовой индекс.

Таблица 23 - Весовые параметры экспериментальных животных и яичек половозрелых самцов

Показатели	Гипоксическая гипоксия Me [25;75] n= 5	Гемическая гипоксия Me [25;75] n= 5	Контроль Me [25;75] n= 5	P
Масса яичек	1,60 [1,50;1,70]	1,57 [1,50;1,74]	1,66 [1,55;1,85]	0,37* 0,74**
Масса крыс	175 [170;177]	130 [125;130]	177 [175;180]	0,001* 0,001**
Весовой индекс	0,900 [0,870;1,000]	1,200 [0,880;1,330]	0,940 [0,860;1,056]	0,002* 0,002**

Примечание: \* - значение «р» при сравнении контрольной группы и гипоксической гипоксии;

\*\* значение «р» при сравнении контрольной группы и гемической гипоксии;

Макроскопически яички опытных и контрольной групп имели овальную форму, серо-желтый цвет, однородную консистенцию, гладкую и блестящую поверхность. В некоторых случаях отмечали выраженную сосудистую сеть. Отчетливо определялся придаток яичка, располагавшийся по латеральному краю яичка (рисунок 41).



Рисунок 41. Макроскопическая картина яичек опытной группы.

В контрольной группе животных при обзорной световой микроскопии яичко окружала плотная белочная оболочка, состоящая из коллагеновых и эластических волокон, между которыми располагались фибробласты и фиброциты. Форма семенных канальцев была округлой или полигональной. На базальной мембране залегали поддерживающие клетки и клетки сперматогенного ряда на различных стадиях дифференцировки. Практически все семенные канальцы содержали клетки герминогенного эпителия на всех стадиях созревания, включая сперматозоиды (рисунок 42).

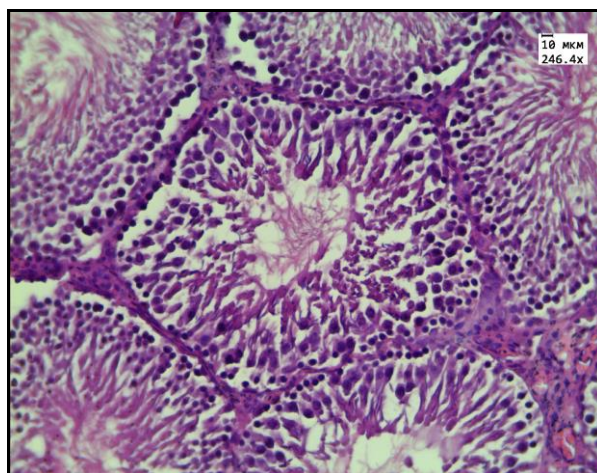


Рисунок 42. Яички половозрелых самцов контрольной группы. Семенные канальцы полигональной формы, сперматогенный эпителий на всех стадиях созревания. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.246,4.

В опытных группах отмечали очаги деструкции базальной мембраны, отек, дистрофические изменения сперматогенного эпителия, некоторые канальцы имели неправильную форму (рисунок 43).

При морфометрическом исследовании в контрольной группе канальцы имели диаметр от 0,21 до 0,25 мкм (медиана 0,24 мкм), количество сперматогоний в канальце находилось в пределах от 53 до 69 (медиана 56), индекс сперматогенеза был равен 4.

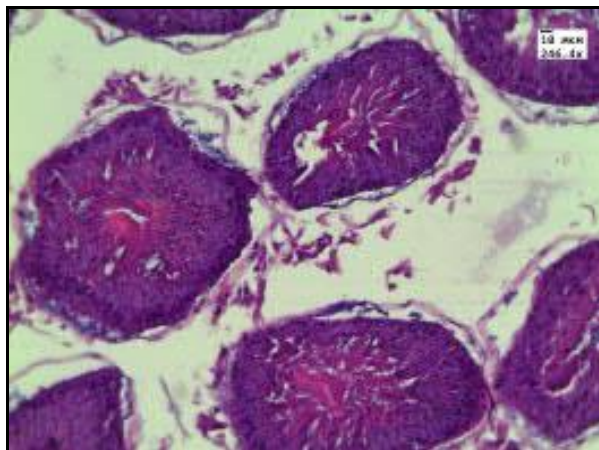


Рисунок 43. Яички половозрелых самцов опытной группы (гемическая гипоксия). Выраженный отек, деформация базальной мембраны канальцев. Окр.: Гематоксилин и эозин. Ув.246,4.

В группе гипоксической гипоксии диаметр канальцев составлял от 0,20 до 0,22 мкм (медиана 0,21 мкм), количество сперматогоний в канальце - от 38 до 51 (медиана 47), индекс сперматогенеза в среднем был равен 3.

В группе гемической гипоксии диаметр канальцев изменялся от 0,15 до 0,17 мкм (медиана 0,16 мкм), количество сперматогоний - от 48 до 63 (медиана 58), индекс сперматогенеза составил 3 (таблица 24).

По результатам непараметрического критерия Манна-Уитни достоверные отличия среди опытных и контрольной групп были по всем параметрам. При сравнении двух опытных групп между собой достоверные различия наблюдались по таким показателям, как диаметр канальцев, количество сперматогоний (таблица 24).

Таблица 24 - Морфометрические показатели тканей яичек половозрелых самцов

Показатели	Гипоксическая гипоксия Ме [25;75]	Гемическая гипоксия Ме [25;75]	Контроль Ме [25;75]	P
1	2	3	4	5
Диаметр канальцев, мкм	0,21 [0,20;0,22]	0,16 [0,15;0,17]	0,24 [0,21;0,25]	<0,001* <0,001**



Продолжение таблицы 24

1	2	3	4	5
Количество сперматогоний	47 [38;51]	58 [48;63]	56 [53;69]	0.001* 0.001**
Индекс сперматогенеза	3 [3;4]	3 [3;4]	4 [3;4]	0,003* 0.001**

Примечание:

\* - значение «р» при сравнении гипоксической гипоксии и контрольной группы;

\*\* - значение «р» при сравнении гемической гипоксии и контрольной группы;

### 6.5. Иммуногистохимическое исследование тканей яичек половозрелых крыс

В контрольной группе экспрессия маркера пролиферации Ki 67 была умеренно и сильно выраженной и наблюдалась во всех канальцах в сперматоцитах и сперматогониях, занимающих преимущественно базальные отделы извитых канальцев. Индекс маркера пролиферации варьировал от 49 до 57%. В опытных группах в отдельных канальцах отмечалась выраженная экспрессия маркера пролиферации в клетках сперматогенного эпителия, обнаруживались канальцы и без экспрессии. Индекс маркера пролиферации в группе гипоксической гипоксии находился в пределах от 28 до 33%, в группе гемической гипоксии – от 17 до 30% (рисунок 44).

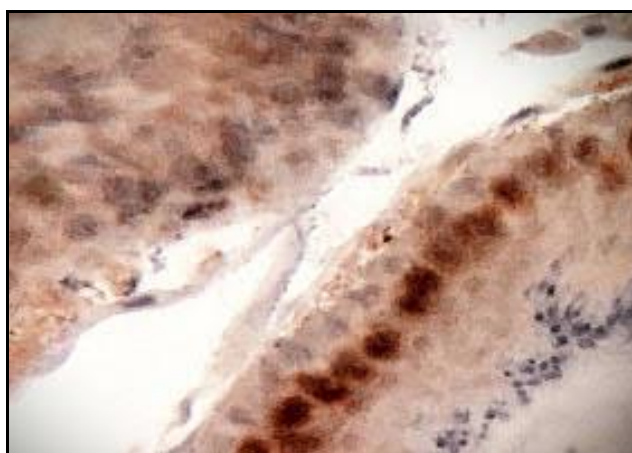


Рисунок 44. Умеренная экспрессия маркера пролиферации Ki 67 в отдельных канальцах яичек крыс при гемической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki67 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

В ткани яичек контрольной группы наблюдалась умеренная экспрессия фактора апоптоза Вах в клетках сперматогенного эпителия преимущественно базальных отделов. Индекс маркера апоптоза колебался в пределах от 8 до 15%.

Экспрессия маркера p53 была слабой и наблюдалась в единичных клетках сперматогенного эпителия. Индекс маркера p53 изменялся от 10 до 20% (рисунок 45).

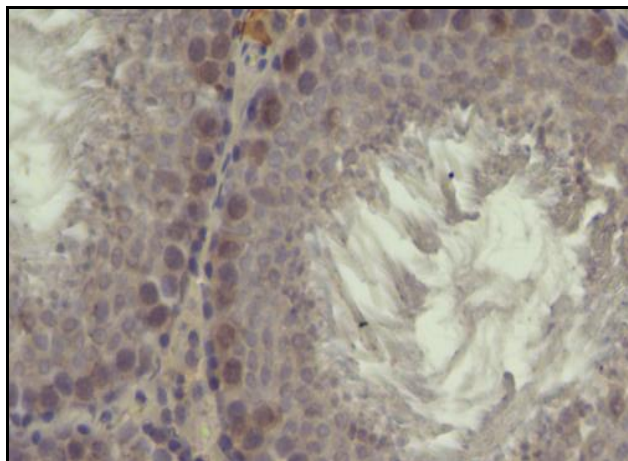


Рисунок 45. Слабая экспрессия маркера p53 в отдельных сперматогониях яичек крыс контрольной группы. Иммуногистохимическая реакция с антителом p53 и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

В опытных группах имелись различия. В опытной группе с гипоксической гипоксией экспрессия маркера апоптоза Вах наблюдалась в виде умеренной цитоплазматической реакции в сперматогониях отдельных семенных канальцев. Индекс маркера апоптоза Вах в этой группе колебался в пределах от 20 до 39%.

В группе гемической гипоксии экспрессия была ядерной, выраженной и наблюдалась во всех клетках сперматогенного эпителия. Индекс маркера апоптоза Вах был от 77 до 86% (рисунок 46).

Экспрессия регулятора апоптоза p53 в обеих опытных группах была умеренно выраженной в базальных отделах канальцев, в остальных клетках сперматогенного эпителия - слабой. Индекс маркера p53 составлял от 20 до 35%.

Экспрессия фактора роста фибробластов в контрольной группе была умеренно выраженной и наблюдалась во всех клетках сперматогенного



эпителия. Индекс фактора роста фибробластов составлял от 80 до 91% (рисунок 47).

В опытных группах экспрессия фактора роста фибробластов была слабо выраженной, местами не определялась. Индекс фактора роста фибробластов колебался от 25 до 37% (рисунок 48).

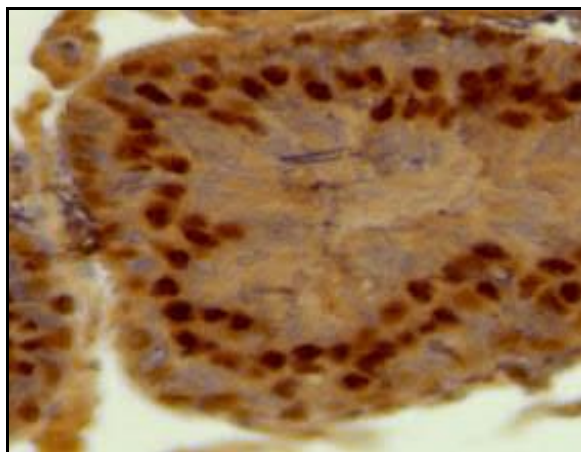


Рисунок 46. Выраженная экспрессия маркера апоптоза Вах в канальцах яичек крыс при гемической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция с антителом Вах и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

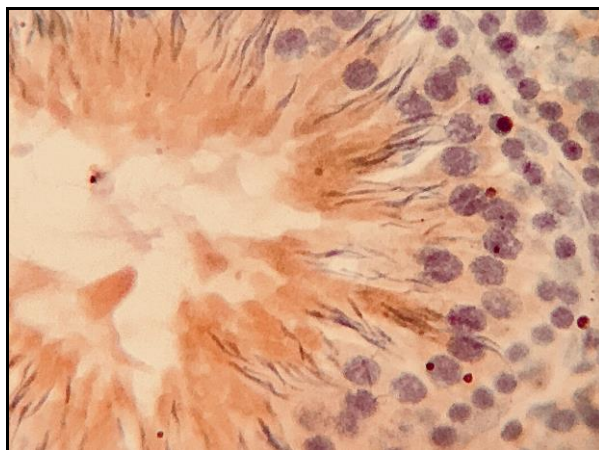


Рисунок 47. Умеренная экспрессия фактора роста фибробластов FGF в канальцах яичек крыс контрольной группы. Иммуногистохимическая реакция с антителом FGF и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

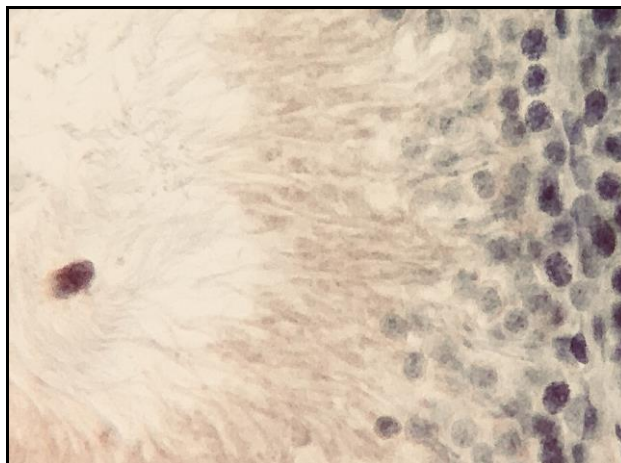


Рисунок 48. Слабая экспрессия фактора роста фибробластов FGF в канальцах яичек крыс при нормобарической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция с антителом FGF и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув.774.

По результатам непараметрического критерия Фишера были выявлены достоверные отличия между опытными группами и контрольной по экспрессии маркеров пролиферации Ki 67, апоптоза Вах и p53, фактора роста фибробластов FGF ( $\phi \geq 2,31$ , таблица 25).

Таблица 25 - Экспрессия маркера пролиферации, апоптоза, фактора роста фибробластов в ткани яичек половозрелых крыс

Маркер	Гипоксия Me [25;75]		Контроль Me [25;75]	φ критерий
	Гипоксическая	Гемическая		
Маркер пролиферации Ki 67	30 [28;33]	25 [17;30]	53 [49;57]	3.338* 4.13*
Маркер апоптоза Вах	25 [20;39]	80 [77;86]	11 [8;15]	2.623* 10.875**
Маркер апоптоза p53	30 [25;34]	31 [25;35]	14 [10;20]	2,772* 2,780**
Фактор роста фибробластов FGF	30 [25;36]	29 [23;37]	85 [80;91]	8.393* 8.549**

Примечание:

\*φ критерий при сравнении гипоксической гипоксии с контрольной группой

\*\* φ критерий при сравнении гемической гипоксии с контрольной группой

Таким образом, у половозрелых самцов в ткани яичек опытных групп отмечали очаги деструкции базальной мембраны, отек, дистрофические изменения сперматогенного эпителия, уменьшение диаметра канальцев и снижение индекса сперматогенеза по сравнению с группой контроля. При иммуногистохимическом исследовании в яичках крыс опытных групп экспрессия маркера пролиферации в отдельных канальцах была сильновыраженной, в других же отсутствовала. 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 опытных группах.

## Глава 7. Сравнительный статистический анализ и обсуждение полученных результатов

### 7.1 Секционный раздел работы

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 (таблица 26). При использовании непараметрического теста Манна-Уитни выявлены достоверные отличия по группам ( $p \leq 0,005$ ). Это свидетельствует о том, что хроническая гипоксия плода развивается у возрастных беременных.

Таблица 26 - Данные возраста матерей в разных подгруппах

Группы	Медиана возраста матерей в группах, лет [25;75]				
	19-22 недели	23-25 недель	26-29 недель	30-40 недель	медиана возраста
Течение беременности					
<b>Острая гипоксия</b>	32 [24;35]	26 [20;35]	24 [23;30]	33 [31;34]	<b>28 [23;35]</b>
<b>Хроническая гипоксия</b>	29 [25;36]	33 [30;38]	34 [33;36]	32 [30;35]	<b>33 [30;36]</b>

При сравнении росто-весовых показателей плодов при острой и хронической гипоксии нами было отмечено, что с увеличением срока гестации масса и рост плодов закономерно увеличиваются (таблица 27).

Надо отметить, что в подгруппах острой и хронической гипоксии в сроки гестации 19-22 недели и 23-25 недель плоды имели практически одинаковые росто-весовые показатели, разница по массе отмечалась в группе 26-29 недель, но и она была статистически не достоверна. В период 30-40 недель гестации

росто-весовые показатели плодов были достоверно выше, чем в группе хронической гипоксии. Это указывает на наличие компенсаторных реакций плода при действии хронической гипоксии на ранних этапах развития, и постепенное их угасание после 26 недели гестации.

При сравнении данных нашего исследования с литературными источниками, которые оценивали нормальные показатели плодов при УЗИ-исследовании (Краснопольский В.И., 2014), значимые различия наблюдались в группе плодов с острой гипоксией в период 19-22 недели гестации. В группе плодов с хронической гипоксией во всех периодах гестации отмечалось достоверное снижение росто-весовых показателей (таблица 27).

Таким образом, проведенный анализ показал, что, начиная с 26 недели беременности, плоды с хронической гипоксией отставали в росте и имели меньшую массу, чем плоды, погибшие от острой асфиксии.

При сопоставлении массы плаценты в группах с острой и хронической гипоксией 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.

При анализе показателей плацентарно-плодового коэффициента (ППК) была выявлена следующая закономерность: в сроки 19-22 недели гестации ППК был выше в группе хронической гипоксии, в сроки 23-25 недель гестации в обеих группах значения были практически одинаковые, в 26-29 недель гестации ППК в группе плодов с хронической гипоксией был ниже, чем в группе плодов с острой гипоксией, а в период 30-40 недель гестации мы регистрировали вновь его повышение.

Таблица 27 - Масса и длина тела плодов при острой и хронической гипоксии

Группы	Показатели	Острая гипоксия Me [25;75]	Хроническая гипоксия Me [25;75]	Данные литературы Me [25;75]	P
<b>19-22 недели</b>	Масса плода (г)	479 [455;487]	477,5 [456;490]	503 [464;537]	0,89
	Длина тела плода (см)	24 [22;25]	23 [21;24]	29 [28;31]	0,358
<b>23-25 недели</b>	Масса плода (г)	640 [554;850]	600 [480;613]	700 [653;815]	0,6
	Длина тела плода (см)	31 [27;34]	29 [25;31]	31 [31;32]	0,7
<b>26-29 недели</b>	Масса плода (г)	1035 [980;1090]	930 [670;1080]	1120 [980;1316]	0,667
	Длина тела плода (см)	36 [32;40]	35 [28;38]	38 [38;39]	0,279
<b>30-40 недель</b>	Масса тела ребенка (г)	3260 [2517;3362]	1550 [1190;1810]	2570 [1840;3100]	0,011
	Длина тела ребенка (см)	49 [45;51]	43 [33;44]	46 [43;50]	0,024

Примечание:

значение «р» для группы плодов с острой и хронической гипоксией

Обычно ППК измеряют у доношенных новорожденных и этот показатель равен 0,11-0,15 (Милованов А.П., 1999; Иванова Л.А., Карпов К.П., 2017).

В нашем исследовании в группе плодов с острой гипоксией этот показатель в 30-40 недель был равен 0,13, а в группе хронической гипоксии – 0,19, что указывает на компенсаторно-приспособительную реакцию фетоплацентарного комплекса.

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 (таблица 28).

В обеих группах размер правого яичка был всегда больше левого, но незначительно, не более чем на 3 мм, что подтверждают исследования других авторов (Wahengbam S., Singh S. A., Damayanti N., 2011).

Таблица 28 - Масса (мг), объем (мм<sup>3</sup>) обоих яичек плодов при острой и хронической гипоксии на разных сроках гестации

Срок гестации, недели	Острая гипоксия		Хроническая гипоксия		P
	Масса, мг Me [25;75]	Объем, мм <sup>3</sup> Me [25;75]	Масса, мг Me [25;75]	Объем, мм <sup>3</sup> Me [25;75]	
19-22	0,160 [0,120;0,180]	36 [24;42]	0,105 [0,090;0,145]	33 [19;50]	0,016* 0,721**
23-25	0,2 [0,170;0,210]	90 [85;114]	0,170 [0,150;0,200]	56 [48;64]	0,131* 0,001**
26-29	0,380 [0,360;0,400]	120 [90;133]	0,270 [0,240;0,300]	76 [63;102]	0,001* 0,024**
30-40	0,770 [0,700;0,820]	255 [149;297]	0,670 [0,520;0,900]	172 [81;238]	0,427* 0,099**

Примечание:

\* значение «р» для массы гонад при сравнении острой и хронической гипоксии

\*\* - значение «р» для объема гонад при сравнении острой и хронической гипоксии

По данным литературы (Чехонацкая М.Л., 2018), при физиологическом течении беременности яички к 20-й неделе гестации опускаются в область внутреннего пахового кольца, затем по паховому каналу, и к 35 неделе гестации

достигают мошонки. Данный процесс происходит под регуляцией андрогенов, которые синтезируются фетальными яичками и надпочечниками плода.

В нашем исследовании в группе плодов, погибших от острой асфиксии, в период 19-22 недели гестации яички обнаруживались в брюшной полости, с 23 до 29 недели гестации – в паховом канале, а в период 30-40 недель – в мошонке. В группе плодов с хронической гипоксией мы наблюдали яички в брюшной полости до 25-й недели гестации, с 26-й недели яички располагались в паховом канале. Ближе к 40-й неделе гестации – в мошонке. Это свидетельствовало о задержке процесса миграции тестикул в условиях хронической внутриутробной гипоксии плода.

При обзорной микроскопии тканей яичек плодов 19-22 недель гестации в группе острой гипоксии наблюдали семенные канальцы с четкой базальной мембраной. Клетки в канальцах располагались хаотично и имели различную величину, но преобладали мелкие клетки. В строме в виде групп и изолированно располагались интерстициальные клетки Лейдига.

В группе плодов с хронической гипоксией в 19-22 недели семенные канальцы плохо визуализировались, базальная мембрана отдельных канальцев была нечеткой. Клетки в канальцах располагались беспорядочно, просвета в канальцах не было, встречались крупные клетки с вакуолизированной цитоплазмой.

По результатам непараметрического теста Манна-Уитни в сроки 19-22 недели статистически значимые отличия наблюдались по следующим показателям: количество канальцев, диаметр канальцев, площадь паренхимы и площадь стромы (таблица 29, рисунок 49).

Описанная нами гистологическая картина совпадала с данными других авторов (Буньков К.В., 2013), которые также описывали три разновидности клеток в тканях яичек плодов: гоноцитов, промежуточных клеток и эмбриональных сперматогоний.



Таблица 29 - Морфометрическая характеристика яичек при острой и хронической гипоксии в 19-22 недели гестации

Показатель	19-22 недели гестации		P
	Острая гипоксия	Хроническая гипоксия	
Количество канальцев в п/зр	18 [14;19]	15 [13;18]	0,0001
Диаметр канальцев, мкм	0,052 [0,050;0,058]	0,048 [0,040;0,052]	0,0001
Количество клеток в канальцах	37 [33;44]	37 [33;40]	0,057
Высота клеток в канальцах, мкм	0,008 [0,007;0,009]	0,007 [0,006;0,008]	0,013
Количество сосудов	5 [3;8]	6 [3;8]	0,634
Количество интерстициальных эндокриноцитов	7 [5;11]	9 [5;10]	0,115
Площадь канальцев, мкм <sup>2</sup>	0,0110 [0,0080;0,0123]	0,0089 [0,0073;0,0101]	0,0001
Площадь стромы, мкм <sup>2</sup>	0,0100 [0,0087;0,0130]	0,0121 [0,0110;0,0137]	0,0001

В период 23-25 недель гестации в группе плодов с острой гипоксией отмечалось преобладание канальцевой ткани. Семенные канальцы плотно располагались друг к другу. В некоторых случаях наблюдали большое количество крупных клеток в их просвете. Клетки сперматогенного эпителия находились ближе к базальной мембране, формируя просвет в извитых семенных канальцах.

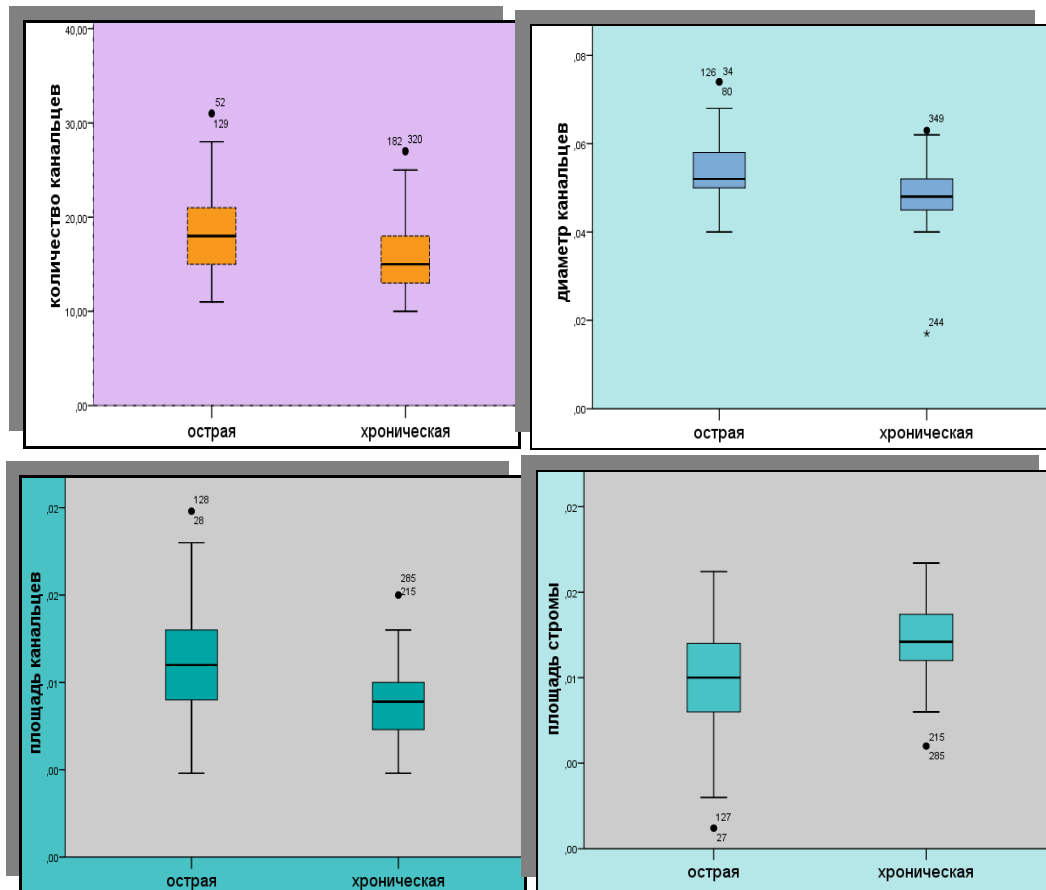


Рисунок 49 - Графики статистически значимых морфометрических показателей тканевых структур яичка плодов при острой и хронической гипоксии на сроке гестации 19-22 недели.

В этот же период в группе плодов с хронической гипоксией был хорошо выражен стромальный компонент. В интерстиции определялось большое количество клеток Лейдига, располагавшихся полями. Базальная мембрана некоторых канальцев была нечеткой, просветы в канальцах отсутствовали, крупные клетки встречались в небольшом количестве.

В сроки 23-25 недель по результатам непараметрического теста Манна-Уитни статистически значимые отличия наблюдались по всем показателям, кроме количества клеток в канальцах (таблица 30, рисунок 50, 51).

В сроки 26-29 недель в группе плодов с острой гипоксией канальцы содержали большое количество первичных гонцитов, сперматогоний и незрелых поддерживающих клеток, плотно лежали друг к другу. В части

канальцев определялся просвет, клетки располагались упорядоченно. Канальцы формировали дольки, количество клеток Лейдига, по сравнению с предыдущими периодами, уменьшалось.

По данным литературы (Wahengbam, S., 2011), после 26-29 недель клетки Лейдига уменьшаются в размерах и становятся похожими на фибробласты, поэтому теряются в интерстиции.

Таблица 30 - Морфометрическая характеристика яичек плодов при острой и хронической гипоксии в 23-25 недель гестации

Показатель	23-25 недель гестации		Р
	Острая гипоксия	Хроническая гипоксия	
Количество канальцев в п/зр	16 [13;21]	15 [14;19]	0,017
Диаметр канальцев, мкм	0,057 [0,050;0,061]	0,053 [0,048;0,063]	0,007
Количество клеток в канальцах	34 [26;46]	35 [29;47]	0,824
Высота клеток в канальцах, мкм	0,008 [0,007;0,009]	0,007 [0,006;0,007]	0,001
Количество сосудов	7 [3;14]	17 [7;22]	0,0001
Количество интерстициальных эндокриноцитов	6 [5;8]	11 [9;14]	0,0001
Площадь канальцев, мкм <sup>2</sup>	0,0119 [0,0098;0,0124]	0,009 [0,0069;0,0105]	0,0001
Площадь стромы, мкм <sup>2</sup>	0,0091 [0,0086;0,0112]	0,0120 [0,0105;0,0141]	0,0001

В 26-29 недель в группе плодов с хронической гипоксией оставался хорошо выраженным стромальный компонент.

В строме располагались мелкие полнокровные сосуды и большое количество интерстициальных эндокриноцитов, иногда наблюдался отек. В некоторых канальцах появлялся просвет, в остальных – клетки располагались хаотично. Базальная мембрана в части канальцев плохо визуализировалась, отмечалась дистрофия эпителия. В 50% наблюдений наблюдалась отслойка сперматогенного эпителия от базальной мембраны.

В сроки 26-29 недель статистически значимые отличия наблюдались по всем показателям (таблица 31, рисунок 50, 51). В сроки 30-40 недель гестации яички имели четкое дольчатое строение и состояли из изогнутых, местами соприкасающихся между собой семенных канальцев. В части канальцев наблюдался внутриканальцевый отек. При морфометрическом исследовании наблюдали дальнейшее увеличение количества, диаметра канальцев, количества клеток в канальцах и общей площади канальцевого аппарата.

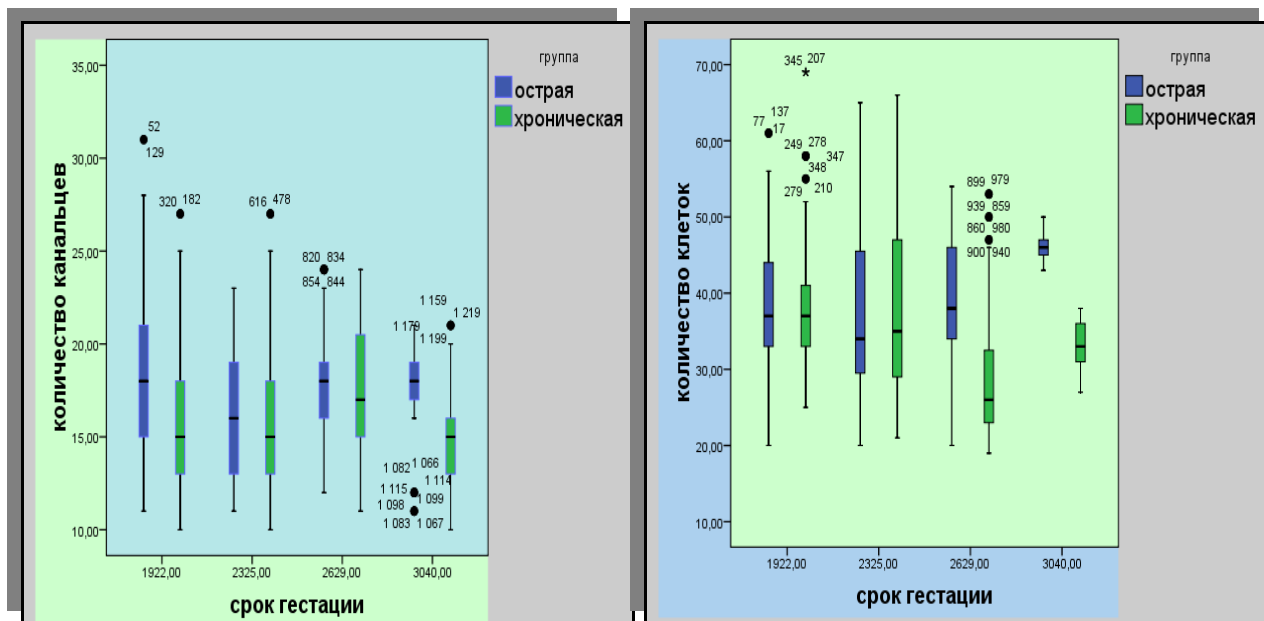


Рисунок 50 - Графики статистически значимых морфометрических показателей структурных компонентов яичек плодов при острой и хронической гипоксии на разных сроках гестации.

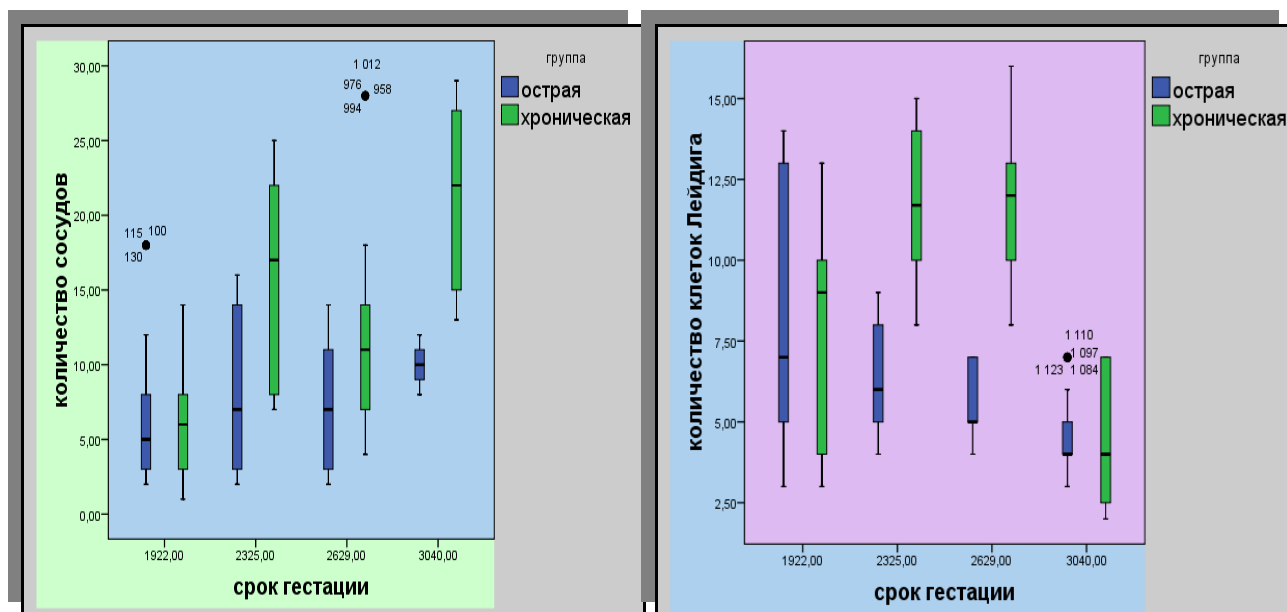


Рисунок 51 - Графики статистически значимых морфометрических показателей структурных компонентов яичек плодов при острой и хронической гипоксии на разных сроках гестации.

Таблица 31 - Морфометрическая характеристика яичек плодов при острой и хронической гипоксии в 26-29 недель гестации

Показатель	26-29 недель гестации		P
	Острая гипоксия	Хроническая гипоксия	
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Количество канальцев в п/зр	18 [16;19]	17 [15;20]	0,001
Диаметр канальцев, мкм	0,062 [0,055;0,068]	0,055 [0,050;0,060]	0,0001
Количество клеток в канальцах	38 [34;46]	26 [23;33]	0,0001
Высота клеток в канальцах, мкм	0,007 [0,006;0,008]	0,008 [0,007;0,008]	0,0001
Количество сосудов	7 [3;11]	11 [7;14]	0,0001

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4
Количество интерстициальных эндокриноцитов	5 [5;7]	12 [10;13]	0,0001
Площадь канальцев, мкм <sup>2</sup>	0,0127 [0,0106;0,0130]	0,0073 [0,0059;0,0085]	0,0001
Площадь стромы, мкм <sup>2</sup>	0,0083 [0,0080;0,0104]	0,0137 [0,0125;0,0152]	0,0001

При хронической гипоксии в яичках продолжала доминировать межканальцевая соединительная ткань, о чем мы упоминали в своей работе (Палатова Т.В. и др., 2017). Отмечалась атрофия канальцев. Сперматогенный эпителий был представлен мелкими и крупными клетками со светлыми ядрами, располагавшимися хаотично. Статистически значимые отличия наблюдались по всем показателям, кроме количества интерстициальных эндокриноцитов (таблица 32, рисунок 50,51).

Таким образом, в нашем исследовании при острой гипоксии 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).

При хронической гипоксии 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, о чем мы писали в ранее опубликованной работе (Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., 2018). 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 32 - Морфометрическая характеристика яичек при острой и хронической гипоксии в 30-40 недель гестации

Показатель	30-40 недель гестации		P
	Острая гипоксия	Хроническая гипоксия	
Количество канальцев в п/зр	19 [17;22]	15 [13;16]	0,0001
Диаметр канальцев, мкм	0,068 [0,067;0,070]	0,064 [0,055;0,068]	0,0001
Количество клеток в канальцах	46 [45;47]	33 [31;37]	0,0001
Высота клеток в канальцах мкм	0,008 [0,008;0,008]	0,007 [0,007;0,008]	0,0001
Количество сосудов в строме	10 [9;11]	22 [15;27]	0,0001
Количество интерстициальных эндокриноцитов	4 [4;5]	4 [2;7]	0,109
Площадь канальцев мкм <sup>2</sup>	0,0137 [0,0135;0,0138]	0,0092 [0,0083;0,0110]	0,001
Площадь стромы мкм <sup>2</sup>	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 показало, что в группе 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 (рисунок 52).

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 плодов с острой гипоксией. В сроки 30 – 40 недель гестации отмечалось снижение активности пролиферативных процессов (рисунок 52).

По результатам непараметрического критерия Фишера были выявлены достоверные отличия по данному показателю в периоды 19-22 недели, 23-25 недель ( $p \leq 0,01$ ).

По данным литературы (Ketola I., Torrani J., Vaskivuo T., Hervä R., 2003), пролиферация клеток в ткани яичек плода происходит в основном до II триместра беременности.

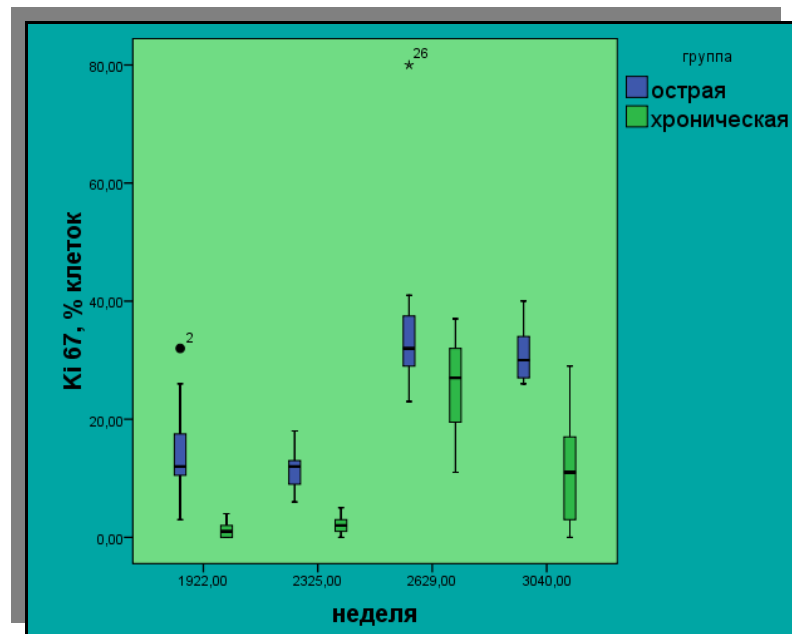


Рисунок 52 - Динамика экспрессии маркера пролиферации Ki67 в разные сроки гестации в группах плодов с острой и хронической гипоксией.

В нашем исследовании максимальные показатели пролиферации отмечали немного позднее, до 29-й недели гестации, что может быть связано с наличием патологии беременности в обеих группах.

Следует отметить, что интерстициальные клетки проявляли большую пролиферативную активность, чем клетки сперматогенного эпителия, что



согласуется с наблюдениями других авторов (Ketola I., Toppari J., Vaskivuo T., Hervä R., 2003).

При исследовании апоптотической активности в группе плодов с острой гипоксией мы наблюдали умеренную и слабую экспрессию маркера апоптоза Bcl2 в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и перитубулярных миоидных клетках. В эпителиоцитах канальцев экспрессии маркера не наблюдалось. При хронической гипоксии экспрессия маркера апоптоза Bcl 2 наблюдалась не только в интерстициальных клетках Лейдига и миоидных клетках, но и в клетках сперматогенного эпителия.

При сравнении данных в группах плодов с острой и хронической гипоксией по результатам непараметрического критерия Фишера были выявлены достоверные отличия в период 19-22 недели ( $p \leq 0,05$ , рисунок 53).

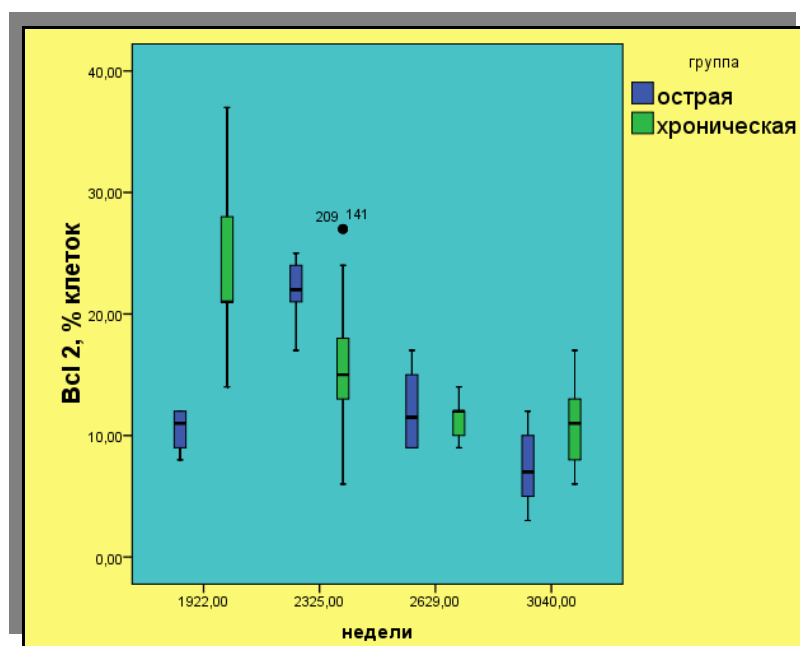


Рисунок 53 - Динамика экспрессии маркера апоптоза Bcl 2 в яичках плодов в разные сроки гестации в группах плодов с острой и хронической гипоксией.

По данным литературы (Murray T.J., Fowler P.A., Abramovich D.R., 2000), в первом триместре беременности экспрессия Bcl 2 наблюдается в клетках сперматогенного эпителия и в клетках Лейдига в строме, во втором – в клетках

Лейдига и перитубулярных миоидных клетках, а в третьем триместре не обнаруживается. Эти данные согласуются с нашими наблюдениями в группе острой гипоксии. При хронической гипоксии на всех сроках гестации экспрессия маркера апоптоза наблюдалась помимо клеток стромы, в клетках сперматогенного эпителия.

Некоторые авторы отмечают (Ketola I., Toppari J., Vaskivuo T., Hervä R., 2003), что в фетальном семеннике человека Bcl-2 экспрессируется, когда происходят значительные изменения морфогенеза и развития яичка, и он может защищать типы соматических клеток от апоптоза во время их пролиферации и созревания, поскольку данный фактор является ингибитором апоптоза и отвечает за выживаемость клеток.

В нашем исследовании при хронической гипоксии максимальная экспрессия данного маркера наблюдалась в период 19-22 недели. Можно предположить, что этот период развития компенсаторных процессов на действие патогенного фактора, в данном случае – гипоксии. После этого срока происходит снижение компенсаторных процессов.

При острой гипоксии пик экспрессии наблюдали в период 23-25 недель, что можно связать с компенсаторным ответом на действие патологии беременности на данном сроке.

Рецепторы эстрогена (рецепторы эстрогена  $\alpha$  и  $\beta$ ; ER $\alpha$  и ER $\beta$ ) локализуются в большинстве типов клеток в организме, в том числе в яичках (Akingbemi B.T., 2005), что свидетельствует о важной роли эстрогена в регуляции функции клеток яичка и репродуктивных событий. Однако существуют противоречивые данные об экспрессии ER $\alpha$  в яичках. Некоторые исследования (Mäkinen S., Mäkelä S., Weihua Z., Warner M., 2001) показали, что ER $\alpha$  не обнаруживается в тканях яичка человека. Однако G. Pelletier, M. El-Alfy (2000) наблюдали ER $\alpha$  в клетках Лейдига человека, а E. Filipiak и соавторы (2013) продемонстрировали иммуноокрашивание ER $\alpha$  в цитоплазме клеток Сертоли и

Лейдига у людей. 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. Эстрогеновый рецептор является аутокринным и паракринным регулятором развития ткани яичка и играет важную роль особенно в период максимальной восприимчивости яичка к различного рода нарушениям. Имеются данные (Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A., 2007), что сверхэкспрессия эстрогенового рецептора инициирует апоптоз зародышевых клеток.

В нашем исследовании в группе хронической гипоксии мы наблюдали выраженную экспрессию эстрогенового рецептора во все сроки гестации, что указывает на выраженную ответную реакцию на повреждающий фактор.

При исследовании экспрессии эстрогенового рецептора в группе острой гипоксии наблюдали преимущественно слабую цитоплазматическую реакцию в интерстиции и в канальцах до 25 недели, затем отмечали единичные клетки с положительной реакцией.

При сравнении данных в группах острой и хронической гипоксии по результатам непараметрического критерия Фишера были выявлены достоверные отличия во все периоды ( $p \leq 0,01$ ).

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 в степени выраженности экспрессии данного маркера в ткани яичек плодов. В группе плодов с острой гипоксией экспрессия преимущественно была сильновыраженной, в то время как при хронической – слабой. В группе плодов с хронической гипоксией на сроке гестации 30-40 недель отмечали подъем экспрессии практически до исходного уровня. При сравнении данных в группах острой и хронической гипоксии по

результатам непараметрического критерия Фишера были выявлены достоверные отличия в периоды 19-22 недели, 23-25 недель ( $p \leq 0,01$ , рисунок 54).

Наши данные несколько отличаются от данных литературы. Так, по наблюдениям J. Merlet, E. Moreau, R. Habert (2007); R.A. Rey, M. Musse, M. Venara, H.E. Chemes (2009), в эмбриональном и раннем постнатальном яичке клетки Лейдига активно секретируют андрогены. Андрогены являются наиболее важными гормонами, контролирующими маскулинизацию репродуктивного тракта и гениталий. В период внутриутробного развития авторы отмечали постепенное нарастание концентрации половых гормонов, достигающих максимального уровня к концу 2-го триместра, с последующим прогрессивным снижением до момента рождения.

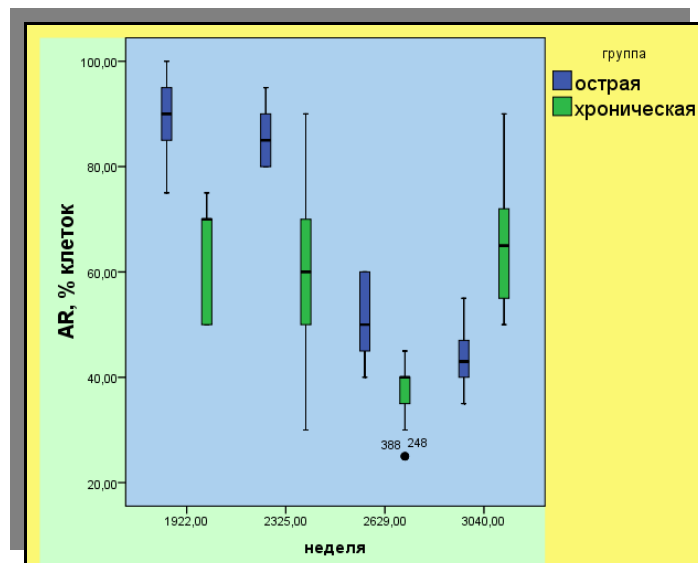


Рисунок 54 - Динамика экспрессии маркера андрогенового рецептора в разные сроки гестации в группах плодов с острой и хронической гипоксией.

В литературе (Samson M., Peale F.V., Frantz G., 2004) имеются данные о том, что VEGF экспрессируется в ткани яичка с 14 недели до рождения и необходим для ангиогенеза органа.

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. При сравнении данных в группах острой и хронической гипоксии по результатам непараметрического критерия Фишера были выявлены достоверные отличия в период 19-22, 23-25 и 26-29 недель ( $p \leq 0,05$ ). Это совпадает с данными тех авторов, которые отмечают, что гипоксия стимулирует экспрессию VEGF, рецепторы которого располагаются во всех популяциях клеток в яичке, а также этот рецептор участвует в регуляции пролиферации половых клеток (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).

При анализе данных иммуногистохимической экспрессии фактора роста фибробластов FGF в ткани яичка в нашем исследовании наблюдалось постепенное увеличение экспрессии фактора роста фибробластов в обеих группах. При хронической гипоксии экспрессия данного маркера была выражена немного сильнее, но статистически не достоверна. После 30 недели гестации экспрессия фактора роста фибробластов практически отсутствовала.

По данным литературы (Jiang X., Skibba M., Zhang C., 2004; Cotton L.M., O'Bryan M.K., Hinton V.T., 2008), факторы роста фибробластов (FGF) классически известны как гормональные факторы, чаще всего они являются митогенами и стимулируют пролиферацию и дифференцировку половых клеток. Однако временная экспрессия FGF и его рецепторов во время развития яичка остается неясной. Исследования показали, что FGF может стимулировать пролиферацию мезенхимальных клеток и способствовать формированию интерстициального компартмента яичка (Colvin J.S., Green R.P., Schmahl J., 2001). Результаты экспериментальных исследований показали, что FGF снижает

апоптоз половых клеток, и экспрессия FGF в яичках повышается *in vivo*, когда яички подвергаются тепловому стрессу (Hirai K., Sasaki H., Yamamoto H., Sakamoto H., 2004).

## 7.2. Экспериментальный раздел работы

В экспериментальном разделе работы мы изучали влияние 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 эхонегативные участки, о чем мы писали в прошлой работе (Palatova T.V., Maslyakova G.N. et al., 2019).

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.

Некоторые авторы связывают изменение числа новорожденных с антенатальной гибелью плодов, а изменение соотношения животных по полу с нарушением процессов инактивации половых гормонов и повышением концентрации эстрогенов под действием патологических факторов во время беременности (Сизоненко М.Л., 2015).

Liu J.X. et al. (2002) в своем исследовании показали, что в условиях хронической внутриутробной гипоксии у потомства наблюдается снижение

массы и длины тела. В нашем исследовании при моделировании гипоксии у новорожденных крысят масса была ниже. Однако данные различия не были статистически значимы.

При обзорной световой микроскопии тканей яичек контрольной группы семенные каналцы были овальной и округлой формы с беспорядочным расположением клеток в них. Между каналцами лежали тонкие волокна нежной соединительной ткани.

При микроскопии тканей яичек опытной группы (гипоксическая гипоксия) отдельные клетки сперматогенного эпителия были вакуолизированы. Отмечалась разреженность каналцевого аппарата за счет фиброза и перитубулярного отека, о чем мы писали ранее (Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Бучарская А.Б., 2017). Статистически значимые отличия в группах гипоксической гипоксии и контрольной наблюдались по следующим параметрам: площадь каналцев и стромы, количество каналцев в поле зрения ( $p \leq 0,05$ , рисунок 55).

При микроскопии тканей яичек опытной группы (гемическая гипоксия) каналцы были уменьшены, отмечался выраженный отек стромы, базальная мембрана отдельных каналцев была фрагментирована, нечеткая. В отдельных полях зрения каналцы отсутствовали, что мы публиковали ранее (Palatova T.V. et al. 2020, 2021).

По результатам теста Манна-Уитни в группах гемической гипоксии и контрольной такие показатели, как диаметр каналцев, площадь каналцев и стромы, количество каналцев, количество сосудов были значимы ( $p \leq 0,05$ , рисунок 55).

В исследованиях J.X. Liu (2002), при действии гипоксии в ткани яичек опытных групп отмечали интерстициальный отек, уменьшение размеров каналцев, увеличение васкуляризации, что совпадает с нашими результатами. В нашем исследовании усиление васкуляризации наблюдалось в группе

гипоксической гипоксии, в группе гемической гипоксии сосудистый компонент был слабо выражен.

При иммуногистохимическом исследовании тканей яичек новорожденных крысят в контрольной группе отмечалась выраженная экспрессия маркера пролиферации Ki67, слабая реакция маркеров апоптоза Вах, p53 и умеренно выраженная экспрессия фактора роста фибробластов FGF.

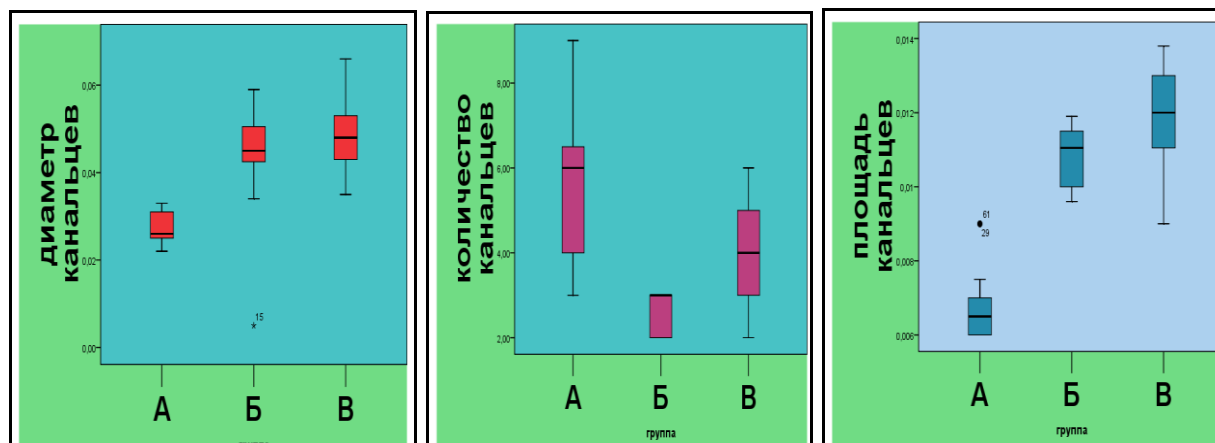


Рисунок 55. Морфометрические показатели гистоструктуры яичек в контрольной и опытных группах. А – гемическая гипоксия, Б - гипоксическая гипоксия, В- контрольная группа.

В опытных группах отмечалась слабая экспрессия маркера пролиферации, умеренная экспрессия маркеров апоптоза, экспрессия фактора роста фибробластов не наблюдалась или была слабовыраженной, о чем мы писали (Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., 2019), и что согласуется с данными других авторов (Reyes, J.G., 2012). По результатам непараметрического критерия Фишера значимые различия в группах наблюдались при экспрессии маркера пролиферации Ki67, апоптоза Вах, фактора роста фибробластов FGF.

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 каналцы имели округлую, овальную и полигональную формы. В просвете каналцев на базальной мембране располагались sustentocytes и клетки сперматогенного ряда на различных стадиях дифференцировки. Практически все семенные каналцы содержали клетки герминогенного эпителия на всех стадиях созревания, включая сперматозоиды.

В опытных группах отмечали очаги деструкции базальной мембраны, отек, дистрофические изменения сперматогенного эпителия, некоторые каналцы имели неправильную форму, о чем мы писали ранее (Морозова В.Д., Чербаев Р.Е., Палатова Т.В., 2020).

По результатам попарного сравнения значимые отличия в опытных группах и контрольной были выявлены по параметрам: диаметр каналцев, количество сперматогоний, индекс сперматогенеза ( $p \leq 0,05$ , рисунок 56).

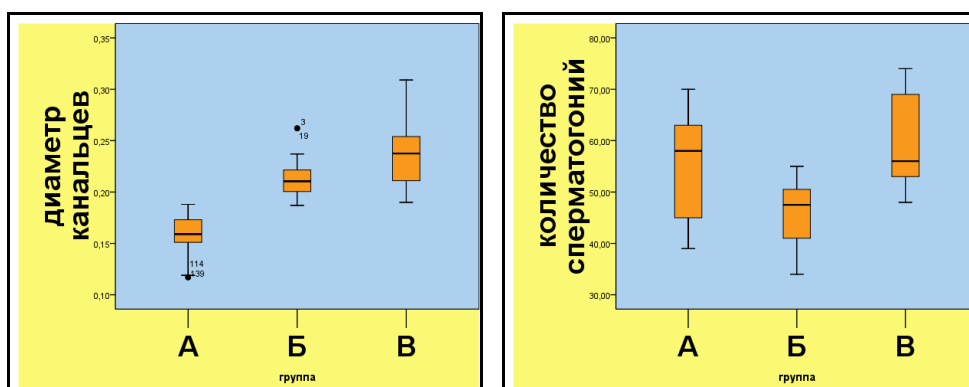


Рисунок 56 - Исследуемые параметры экспериментальных групп. А – гемическая гипоксия, Б - гипоксическая гипоксия, В- контрольная группа

При иммуногистохимическом исследовании тканей яичек половозрелых крыс в контрольной группе экспрессия маркера пролиферации Ki67 была выраженной, экспрессия маркера апоптоза Вах была преимущественно слабой, фактор роста фибробластов экспрессировался умеренно (рисунок 57).

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 (рисунок 57).

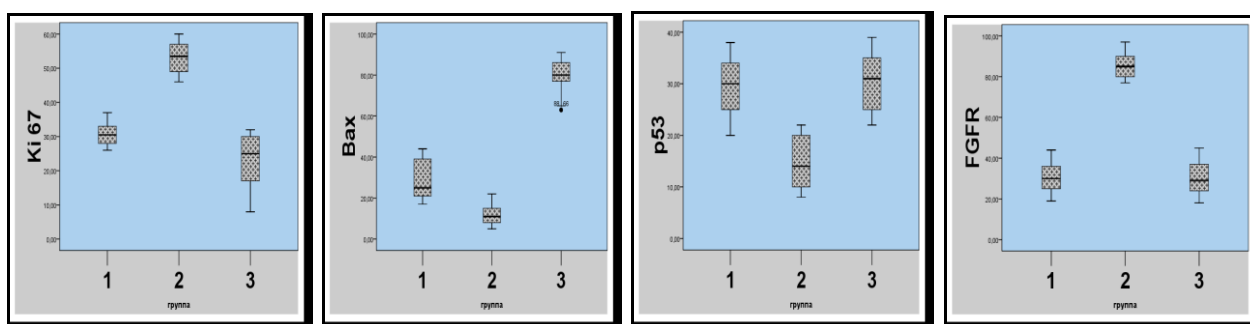


Рисунок 57 - Результаты иммуногистохимического исследования яичек половозрелых особей. 1-гипоксическая гипоксия, 2- контроль, 3- гемическая гипоксия.

Выявленные в ходе исследования морфофункциональные изменения диаметра извитых семенных канальцев указывают на угнетение процессов сперматогенеза, что согласуется с литературными данными (Саяпина И.Ю., Целуйко С.С., 2013). Некоторые исследователи полагают, что уменьшение размеров извитых семенных канальцев может быть обусловлено уменьшением активности клеток Сертоли (Odum, J., Creasy D., Cartwright J. et al., 2009), что, в свою очередь, связывают со снижением уровня тестостерона в яичках.

Некоторое увеличение количества сперматогоний может свидетельствовать о развитии неспецифических адаптивных механизмов в организме экспериментальных животных (Потапов С.Н., Яковцова А.Ф., 2009).

Показатель индекса сперматогенеза как один из наиболее чувствительных критериев негативного влияния факторов эндо- и экзогенной природы, свидетельствует об угнетении процесса сперматогенеза.

Таким образом у животных в условиях хронической гипоксии происходит торможение процесса сперматогенеза, что подтверждают морфометрические и иммуногистохимические методы 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.

На аутопсийном материале было установлено, что в условиях хронической гипоксии снижается пролиферативная активность, усиливается апоптоз зародышевых клеток, наблюдается повышение экспрессии васкулоэндотелиального фактора. Изменение гормональной активности проявляется в виде снижения экспрессии андрогенового рецептора и усилении 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) развивалась 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 изменялись следующие показатели: 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 гипоксии сохраняются у половозрелых крыс самцов. Отмечается уменьшение диаметра канальцев, снижение индекса сперматогенеза, снижение пролиферативной активности и функции фактора роста фибробластов на фоне усиления апоптотической активности сперматогенного эпителия.

### **Практические рекомендации:**

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.

Полученные в результате исследования параметры гонад плодов, полученных от матерей при относительно благополучном течении беременности, могут быть использованы для сравнения размеров и массы яичек в патологоанатомической и судебно-медицинской практике.

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.

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 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

SRV – ген, кодирующий фактор развития семенников

SOX9 – ген, играющий роль в детерминации и дифференцировке пола

VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста

ВПР – врожденный порок развития

ИЭ – интерстициальные эндокриноциты

ППК – плацентарно-плодовый коэффициент

ПСИ – паренхиматозно-стромальный индекс

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

### Список литературы

1. Артифексова, М.С. Принципы профилактики полового развития у мальчиков / М.С. Артифексова, С.Б. Артифексов, О.В. Халецкая, А.А. Артифексова // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. б/н. С. 93-94.
2. Буньков, К.В. Сравнительные морфометрические исследования яичек у плодов антенатального периода / К.В. Буньков, А.Ю. Кузьменков, А.Л. Савченков // Проблемы репродукции. – 2013. № 6. С. 66-71.
3. Буштырева, И.О. Некоторые патогенетические механизмы гестоза / И.О. Буштырева, М.П. Курочка, Е.С. Будник [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2009. № 7. С. 27-30.
4. Вишнякова, Ж.С. Активность ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови новорожденных детей при хронической внутриутробной гипоксии плода / Ж.С. Вишнякова, О.П. Петрушова, А.С. Купрюшин // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5-4. – С. 735-737.
5. Володин, Н.Н. Перинатальная медицина: проблемы, пути и условия их решения / Н.Н. Володин // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2004. №5. С. 18-23.
6. Галкина, Ю.В. Патоморфология яичников и клинические особенности нарушения репродуктивной функции у женщин с нейрообменно-эндокринным синдромом: автореферат диссертации...кандидата медицинских наук: 14.00.15 / Галкина Юлия Викторовна; [Место защиты: ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН]. - Новосибирск, 2007. - 37 с.
7. Гамидов, С.И. Оценка влияния комплекса «БЕСТФертил» на показатели спермограммы, оксидативного стресса и фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с бесплодием / С.И. Гамидов, А.Ю. Попова, Н.Г. Гасанов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. 2019. № 1. С. 91-98.
8. Герасимович, Г.И. Онтогенез и врожденные аномалии женских половых органов / Г.И.Герасимович. – Минск, БГМУ. – 2010. – 60 с.



9. Гончарова, Н.Н. Медико-генетические аспекты бесплодия / Н.Н.Гончарова, Е.Ю.Мартышкина, Т.В. Казначеева [и др.] // Акушерство. Гинекология. Репродукция. – 2012. – Т.6 № 2. – С.35-40.
10. Гланц С. Медико–биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 459с.
11. Гржибовский, А. М. Анализ трех и более независимых групп 232 количественных данных / А. М. Гржибовский // Экология человека. - 2008. - № 3. - С. 50-58. - Библиогр.: С. 58.
12. Гублер, Е. В. Применение непараметрических методов статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – 140 с.
13. Данилова, Т.И. Крипторхизм и современный подход к профилактике мужского бесплодия / Т.И. Данилова, В.Ю. Тихомирова, Е.А. Мельникова, В.Н. Хлудеев // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2006. - № 4. – С.59-60.
14. Дедов, И.И. Половое развитие детей: норма и патология / И.И. Дедов, Т.В. Семичева, В.А. Петеркова. – М, Медицина. – 2002. – 232 с.
15. Дорохович, И.В. Морфология мужской половой железы у зародышей и плодов человека / И.В. Дорохович, Г.П. Дорохович //Медицинский журнал. - 2014. Т. 1 № 47. С. 61-64.
16. Додхоев, Д.С. Механизмы задержки внутриутробного развития ребенка при хронической плацентарной недостаточности: диссертация.... доктора медицинских наук: 14.00.09 / Додхоев Джамшед Саидбобоевич; [Место защиты: Таджикский государственный медицинский университет]. - Душанбе, 2009. - 181с.
17. Еркенова, С.Е. Современные методы диагностики и лечения бесплодного брака / С.Е.Еркенова, А.Н.Эубэшр, М.Б.Жусупбек [и др.] // Вестник КазНМУ. – 2017. - № 4. – С.3-5.

18. Жебентяев, А.А. Мужское бесплодие / А.А. Жебентяев // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2008. Т. 7 № 2. С. 1-11.
19. Зенкина, В.Г. Морфологические особенности яичников плодов и новорожденных / В.Г. Зенкина // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-3. – С. 504-508.
20. Иванова, Л.А. Прогностическая ценность морфометрических параметров эхокардиографии и плацентометрии / Л.А. Иванова, К.П. Карпов // Лучевая диагностика и терапия. – 2017. - № 4. С. 38-42.
21. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачев. – М, Профиль. - 2010. – 358 с.
22. Карпова, И.Ю. Изучение влияния хронической гипоксии на течение беременности и развитие потомства в эксперименте / И.Ю. Карпова, В.В. Паршиков, А.А. Миронов, Т.И. Соловьева [и др.] // Медицинский альманах. 2011. № 5. С. 55-57.
23. Кожухарь, В.Г. Первичные половые клетки млекопитающих и человека. Происхождение, идентификация, миграция / В.Г. Кожухарь // Цитология. - 2011. Т.53 № 3. – С. 211-220.
24. Кожухарь, В.Г. SRY и SOX9 — главные факторы генетической детерминации пола у млекопитающих / В.Г. Кожухарь // Цитология. - 2012. Т.54 № 5. – С. 390-404.
25. Кондратьева, Т.А. Современные подходы к диагностике и лечению бесплодия / Т.А. Кондратьева, Н.В. Артымук // Мать и дитя в Кузбассе. 2009. Т. 37 № 2. С. 3-6.
26. Кравцова, Н.В. Сопоставление морфологических изменений плаценты и уровня карбоксигемоглобина крови беременных при внутриутробной гипоксии

- плода различной степени выраженности / Н.В. Кравцова, Н.В. Черепкова // Медицинский журнал Западного Казахстана. 2010. Т. 26 № 2. С. 75-77.
27. Кузнецов, П.А. Гипоксия плода и асфиксия новорожденного / П.А. Кузнецов, П.В. Козлов // Лечебное дело. 2017. № 4. С. 9-15.
28. Кузнецова, С.В. Нарушение сперматогенеза при острой гипобарической гипоксии: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.00.16. / Светлана Вадимовна Кузнецова; [Место защиты: ГОУ ВПО «НиЖГМА РосздРава»]. – Нижний Новгород, 2006. - 131 с.
29. Кулаков, В.И. Плацентарная недостаточность и инфекция / В.И. Кулаков, Н.В. Орджоникидзе, В.Л. Тютюнник. - М.; 2004. 494с.
30. Кульченко, Н.Г. Морфологические изменения в ткани яичка при бесплодии / Н.Г. Кульченко, Г.А. Демяшкин // Андрология и генитальная хирургия. 2016. Т.17 № 3. С. 38-42.
31. Клевезаль, Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих / Г.А. Клевезаль. – Москва : КМК, 2007. – 283 с.
32. Макацария, А.Д. Плацентарная недостаточность при осложненной беременности и возможности применения дипиридамола / А.Д. Макацария, В.О. Бицадзе, Д.Х. Хизроева, И.В. Хамани // Акушерство, Гинекология и Репродукция. 2016. Т.10 № 4. С.72-82.
33. Марковский, В.Д. Влияние различных вариантов гипоксии на количество крысят в помете и их соматометрические показатели (экспериментальное исследование) / В.Д. Марковский, И.Д. Сорокина, М.С. Мирошниченко [и др.] // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2014. Т. 3 № 64. С. 91-94.
34. Маслякова, Г.Н. 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
35. Маслякова, Г.Н. 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.
36. Маслякова, Г.Н. 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.
37. Медведева, А.В. Морфология яичников плодов, новорожденных и детей при нормальном и патологическом течении беременности: диссертация.... кандидата медицинских наук: 14.00.15 / Медведева Анна Валентиновна; [Место защиты: ГОУ ВПО "Саратовский государственный медицинский университет"]. - Саратов, 2007. - 167 с.
38. Милованов, А.П. Патология системы мать-плацента-плод: руководство для врачей / А.П. Милованов. - М.: Медицина, 1999. 448 с.
39. Мирошниченко, М.С. Влияние хронической внутриутробной гипоксии на морфофункциональные особенности органов мочевыделительной системы плодов и новорожденных / М.С. Мирошниченко, В.Д. Марковский, И.В. Сорокина // Морфология. 2013. Т.7 № 2. С. 57-60.
40. Михайлов, А.В. Плод и новорожденный как пациенты / А.В. Михайлов, Д.О. Иванов. - СПб.: ИД «Петрополис», 2015. 1272 с.
41. Морозова, В.Д. Влияние внутриутробной гемической гипоксии на репродуктивную функцию яичек / В.Д. Морозова, Р.Е. Черebaев, Т.В. Палатова // Всероссийская научно-практическая конференция Медицинская весна 2020. (Москва, Сеченовский Университет, 7-8 февраля 2020 года): сборник тезисов. С.423-424.
42. Мутовин, Г.Р. Гены и онтогенез репродуктивной системы; основные нарушения дифференцировки пола / Г.Р. Мутовин, О.Г. Иванова, С.С. Жилина // Педиатрия: Журнал им. Г. Н. Сперанского. - 2009. Т. 88 № 6. С. 40-47.

43. Мухачева, С.В. Состояние семенников рыжей полевки в условиях химического загрязнения среды обитания / С.В. Мухачева, Ю.А. Давыдова // Успехи современного естествознания. – 2006. – №2. – С. 65-66.
44. Отеллин, В.А. Последствия пренатального воздействия гипоксии на развивающийся мозг / В.А. Отеллин, Е.Г. Гилерович, Л.И. Хожай [и др.] // Мед.акад.журнал.2004. Т.4 № 4. С. 38-45.
45. Омуркулова, Г. С. Течение беременности и исход родов у беременных с внутриутробной гипоксией плода в зависимости от метода родоразрешения / Г.С. Омуркулова // Наука и новые технологии. 2009. № 4. С. 88-90.
46. Палатова, Т.В. 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.
47. Палатова, Т.В. Роль антенатальной гипоксии в развитии яичек плода (экспериментальное исследование) / Т.В.Палатова, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская // Молодежь - практическому здравоохранению. - 2019. - С. 312-315.
48. Палатова, Т.В. 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 Международной научной конференции, посвящённой 110-летию СГУ имени Н.Г. Чернышевского. - 2019. - С.38-40.
49. Палатова, Т.В. Влияние внутриутробной гипоксии на репродуктивную функцию яичек / Т.В. Палатова, Г.Н. Маслякова //Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей, посвященная 25-летию медицинского факультета СПбГУ (Санкт-Петербург, 26 сентября 2020 года): тезисы доклада конференции. С.15-16.

50. Палатова, Т.В. Влияние хронической внутриутробной гипоксии на репродуктивную систему плода (экспериментальное исследование) / Т.В.Палатова, Г.Н.Маслякова, А.Б. Бучарская, Воронина Е.С., Медведева А.В., Пахомий С.С. // Научный диалог: вопросы медицины. Сборник научных трудов по материалам XX международной научной конференции (Санкт-Петербург, 15 июля 2019 года): статья в сборнике трудов научной конференции. С.9-13.
51. Палатова, Т.В. 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.
52. Поздняк, А.О. Клинические варианты врожденного первичного гипогонадизма у мальчиков / А.О. Поздняк // Практическая медицина. – 2010. Т. 4 № 43. С. 109-11.
53. Потапов, С.Н. 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.
54. Радченко, О.Р. Методологические подходы к организации работы по профилактике бесплодия среди мужского населения на региональном уровне / О.Р. Радченко, Л.А. Балабанова // Фундаментальные исследования. 2011. № 11. С. 354-357.
55. Райгородская, Н.Ю. Физиологические периоды развития половой системы мальчиков (обзор) / Н.Ю. Райгородская // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2014. Т. 4 № 1. - С. 76-80.
56. Рябова, С.А. Прогностическая и диагностическая значимость методов оценки состояния плода при плацентарной недостаточности: диссертация... кандидата медицинских наук: 14.01.01 / Рябова Светлана Александровна; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»]. – Самара, 2017. – 176 с.

57. Савельева, Г. М. Плацентарная недостаточность / Г.М. Савельева, М.В. Федорова, П.А. Клименко, Л.Г. Сичинава. - М, Медицина. - 1991. - 272 с.
58. Саргсян, О.Д. Особенности ангиогенных факторов и цитокинового баланса у женщин в динамике физиологической и осложненной беременности в зависимости от пола плода: автореферат диссертации ...кандидата медицинских наук: 03.03.01, 14.01.01 / Саргсян Оксана Джемсиовна; [Место защиты: Волгоградский государственный медицинский университет]. – Волгоград, 2015. – 24 с.
59. Саяпина, И.Ю. 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.
60. Сидорова, И.С. Клинико-диагностические аспекты фетоплацентарной недостаточности / И.С. Сидорова, И.О. Макаров. - М.: МИА; 2005. 296с.
61. Симрок, В.В. Перинатальная смертность: причины, факторы риска, пути снижения / В.В. Симрок, Ю. Н. Слепичко, Т. П. Жмурко, А. А. Аверина // Таврический медико-биологический вестник. 2012. Т. 15 № 2. С. 280-282.
62. Соседова, М.Л. Сравнительная морфологическая оценка нейротоксичности сулемы и гипоксии / М.Л. Соседова, С.С. Голубев, Е.А. Титов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2007. Т.1 № 53. С. 100-102.
63. Сизоненко, М.Л. Роль хронических экспериментальных поражений гепатобилиарной системы матери различного генеза в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы потомства: автореферат диссертации...доктора медицинских наук: 03.03.04 / Сизоненко Максим Леонидович; [Место защиты: ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации]. – Оренбург, 2015. – 47 с.
64. Тавокина, Л.В. Мужское бесплодие. Генетические аспекты / Л. В. Тавокина // Почки. - 2014. - № 2. - С. 9-13.

65. Уварова, Е.В. Гипогонадотропный гипогонадизм (обзор литературы) / Е.В. Уварова, Е.В. Трифонова // Педиатрическая фармакология. – 2008. Т. 5 № 4. С. 45-53.
66. Фомина, М.П. Внутриутробная гипоксия и недостаточный рост плода, ассоциированные с плацентарными нарушениями: автореферат диссертации доктора медицинских наук: 14.01.01 / Фомина Марина Петровна; [Место защиты: Беллорусский государственный медицинский университет]. – Минск, 2016. – 47 с.
67. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. – М, Медицина. - 2005. – 835 с.
68. Черкесова, Д.У. Функциональные изменения в системе мать-плод при экспериментальной хронической нитритной гипоксии / Д.У. Черкесова, Д.Н. Магомедгаджиева, А.И. Рабаданова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. 2009. Т.11 № 1-5. С. 934-937.
69. Черных, А.М. Мониторинг врожденных пороков развития у детей в Курской области / А.М. Черных, М.Ю. Селютина, И.Л. Горяинова // Гигиена и санитария. - 2012. № 5. С. 54-55.
70. Чехонацкая, М.Л. Влияние угрозы прерывания беременности на формирование яичек плода / Чехонацкая М.Л., Колесникова Е.А., Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Василевич Л.К. // федеральный конгресс «Сексуальное здоровье мужчины. Текущие интересы науки и здравоохранения» с международным участием (Ростов-на-Дону, 26-27 сентября 2013 года): статья в сборнике научных трудов. С. 107-108.
71. Чехонацкая, М.Л. Эхографическая оценка физиологического развития органов половой системы плодов мужского пола при физиологическом течении беременности / М.Л. Чехонацкая, Е.А. Колесникова, Н.Ф. Хворостухина, И.А.



Чехонацкий, Д.А. Новичков, Н.Н. Степанова // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 5.

72. Шерстюк, С.А. Морфологические особенности семенных желез детей умерших в возрасте до 6 месяцев от ВИЧ-инфицированных матерей / С.А. Шерстюк // Мир медицины и биологии. – 2012. Т. 1 № 8. С. 166-170.

73. Щербаков, В.И. Механизмы внутриутробного программирования ожирения у детей / В.И. Щербаков, Т.И. Рябиченко, Г. А. Скосырева, А.Н. Трунов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2013. № 5. С. 8-14.

74. Юнусова, Ю.Р. Патологическая анатомия тканей органов плода и последа при внутриутробной гипоксии / Ю.Р. Юнусова, А.Д. Куклева, И.В. Секретарева // Модернизация современной науки: новые реалии и проблемы современных исследований в России и мире. Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции. 2015. С. 25-31.

75. Arenas, M.I. Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle / M.I. Arenas, M. Royuela, M.V. Lobo, [et al.]. // *Journal of Anatomy*. – 2001. – V. 199. № 4. - P. 465-472.

76. Assinder ,S. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells / S. Assinder , R. Davis,M. Fenwick, A.Glover // *Reproduction*. 2007.V.133 № 1. P. 11-9.

77. Akingbemi, B.T. Estrogen regulation of testicular function / B.T. Akingbemi // *Reprod Biol Endocrinol*. 2005. № 3.P.51.

78. Balen, F.V. Quality of Infertility Care in Poor-Resource Areas and the Introduction of New Reproductive Technologies / F.V. Balen, T. Gerrits // *Hum. Reprod*. – 2001. V. 16. № 2. – P.215-219.

79. Barker, D.J. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis / D. J. Barker, J.G. Eriksson, T. Forsén, C. Osmond. // *Int J Epidemiol*. – 2002. № 31. P. 1235–1239.

80. Blais, L. Use of inhaled corticosteroids following discharge from an emergency department for an acute exacerbation of asthma / L. Blais, M.F. Beauchesne // *Thorax*. – 2004. V. 59 № 11. P. 943–947.
81. Boukari, K. Human fetal testis: Source of estrogen and target of estrogen action / K. Boukari, M. L. Ciampi, A. Guiochon-Mantel, J. Young, M. Lombès, G. Meduri // *Human Reproduction*. 2007. V. 22 № 7. P.1885-92
82. Borday, C. Expression and localization of aromatase during fetal mouse testis development / C. Borday, J. Merlet, C. Racine, [et al.]. // *Basic and Clinical Andrology*. – 2013. – V. 1. № 23. - P. 12.
83. Bruick, R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor / R.K. Bruick // *Genes Dev*. 2003. V.17 № 21. P. 2614-23.
84. Connolly, F. Excess Androgens in Utero Alters Fetal Testis Development / F. Connolly, M.T. Rae, L. Bittner, [et al.]. // *Endocrinology*. - 2013. – V. 154. № 5. -P. 1921-1933.
85. Cotton, L.M. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction / L.M.Cotton, M.K. O'Bryan, B.T. Hinton // *Endocr Rev*. 2008. V.29 № 2. P.193-216.
86. Colvin, J.S. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9 / J.S.Colvin, R.P. Green, J. Schmahl, B. Capel, D.M. Ornitz // *Cell*. 2001. V. 104 № 6. P.875-89.
87. Dundar, M. Determination of apoptosis through bax expression in cryptorchid testis: an experimental study / M. Dundar, I. Kocak, N. Culhaci // *Pathol. Oncol. Res*. – 2005. V. 11. № 3. - P.170-173.
88. Eriksson, J.G. The prenatal origins of lung cancer. I. The fetus /J.G. Eriksson , K. L. Thornburg, C. Osmond, [et al.]. // *Am J Hum Biol*. 2010. V. 22 № 4. P. 508-11.

89. Farias, J.G. Time course of endocrine changes in the hypophysis-gonad axis induced by hypobaric hypoxia in male rats / J.G. Farias, E. Bustos-Obregón, P.J. Tapia, [et al.]. // *J Reprod. Dev.* – 2008. – V. 54. № 1. - P. 18-21.
90. Filipiak, E. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis / E. Filipiak, D.Suliborska, M. Laszczynska, R. Walczak-Jedrzejowska, E. Oszukowska, K. Marchlewska, K. Kula, J. Slowikowska-Hilczer // *Folia Histochem Cytobiol.* 2013. V.50 № 3. P.340-5.
91. Gaskell, T.L. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations / T.L. Gaskell, A. Esnal, L.L. Robinson, [et al.]. // *Biology of reproduction.* – 2005. V. 71 № 6. P. 2012-2021.
92. Gelbaya, T.A. Definition and epidemiology of unexplained infertility / T.A. Gelbaya, N. Potdar, Y.B. Jeve, [et al.]. // *Obstet Gynecol Surv.* – 2014. V. 69 № 2. P. 109-15.
93. Gunn, A.J. Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models / A.J. Gunn, L. Bennet // *Clin. Perinatol.* 2009. V. 36 № 3. P. 579-93.
94. Haase, V.H. Hypoxia-inducible factors in the kidney / V.H. Haase // *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2006. V. 291 № 2 P. 271-281.
95. He, W. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan g-protein-coupled receptors / W. He, F. J-P. Miao, D. C-H Lin, [et al.]. // *Nature.* 2004. V. 429 № 6988. P. 188-93.
96. Hutter, D. Causes and mechanisms of intrauterine hypoxia and its impact on the fetal cardiovascular system: a review / D. Hutter, J. Kingdom, E. Jaeggi // *International Journal of Pediatrics.* – 2010. V.2010. P. 1-9.
97. Hirai, K. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition / K. Hirai, H. Sasaki, H. Yamamoto, H. Sakamoto, Y. Kubota, T. Kakizoe, M. Terada, T. Ochiya // *Exp Cell Res.* 2004. V. 294. № 1. P.77-85.

98. Hwang, G.S. Effect of hypoxia on the release of vascular endothelial growth factor and testosterone in mouse TM3 Leydig cells / G.S. Hwang, S.W. Wang, W.M.Tseng, [et al.]. // *Am. J Physiol*- 2007. V. 292. № 6. – P. 1763-1769.
99. Johnson, L.N. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis / L.N. Johnson, I.E. Sasson, M.D. Sammel, [et al.]. // *Fertil Steril*. – 2013. V. 100 № 3. P. 704-11.
100. Jiang, X. The Roles of Fibroblast Growth Factors in the Testicular Development and Tumor / X. Jiang, M. Skibba, C. Zhang, Y. Tan, Y.Xin, Y. Qu // *J Clin Endocrinol Metab*. 2004. V.89 № 8. P. 4078-88.
101. Jungwirth, A. Male infertility / A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, [et al.]. // *European Association of Urology*. – 2016. P. 46.
102. Kerr, C.L. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis / C.L. Kerr, C.M. Hill, P.D. Blumenthal, [et al.]. // *Stem. Cells*. – 2008. V. 26. № 2. – P. 412-421.
103. Ketola, I. Transcription factor GATA-6, cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in human fetal testis / I. Ketola, J. Toppari, T. Vaskivuo, R. Herva, J. S. Tapanainen, M. Heikinheimo // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003. V. 88 № 4. P.1858–1865.
104. Khorram, O. Maternal undernutrition inhibits angiogenesis in the offspring: a potential mechanism of programmed hypertension / O. Khorram, N. Khorram, M. Momeni, [et al.]. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007. V. 3 № 2. P. 745-53.
105. Kumar, N. Trends of Male Factor Infertility, an Important Cause of Infertility: A Review of Literature / N. Kumar, A.K. Singh // *J Hum. Reprod. Sci*. – 2015. V. 8. № 4. – P. 191-196.

106. Kuasne, H. Nuclear loss and cytoplasmic expression of androgen receptor in penile carcinomas: role as a driver event and as a prognosis factor / H. Kuasne, M. C. Barros-Filho, F. A. Marchi, S. A. Drigo, C. Scapulatempo-Neto, E. F. Faria, S. R. Rogatto // *Virchows Archiv*. 2018. V. 473. P. 607–614.
107. Kwon, E.J. What is fetal programming? a lifetime health is under the control of in utero health / E.J. Kwon, Y.J. Kim. // *Obstet Gynecol Sci*. – 2017. V. 60 № 6. P. 506–519.
108. Leese, H.J. Embryo Viability and Metabolism: Obeying the Quiet Rules / H.J. Leese, R.G. Sturmey, C.G. Baumann, T.G. McEvoy // *Hum Reprod*. – 2007. V. 22 № 12. P. 3047-50.
109. Liu, J.X. Hypoxia alters testis development in neonatal rats / J.X. Liu, J.Z. Du // *Neuro Endocrinology Letters*. – 2002. – V.23. - № 3. - P. 231-237.
110. Mäkinen, S. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis/ S. Mäkinen, S. Mäkelä, Z. Weihua, M. Warner, B. Rosenlund, S. Salmi, O. Hovatta, J.A. Gustafsson // *Mol Hum Reprod*. 2001. V. 7 № 6. P. 497-503.
111. Merlet, J. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice / J. Merlet, E. Moreau, R. Habert, C. Racine // *Cell Cycle*. 2007. V.6 № 18. P. 2258-62.
112. Miquerol, L. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression / L. Miquerol, B.L. Langille, A. Nagy // *Development*. – 2000. V. 127. № 18. – P. 3941-3946.
113. Molyneaux, K.A. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival / K.A. Molyneaux, H. Zinszner, P. Kunwar, [et al.]. // *Development*. – 2003. № 130. – P. 4279-4286.
114. Moon, E. J. The potential role of intrinsic hypoxia markers as prognostic variables in cancer / E.J. Moon, J-T. A. Chi, D.M. Brizel, M.W. Dewhirst // *Antioxidants and Redox Signaling*. 2007. V. 9 № 8. P. 1237-94

115. Mohammed, H. M. Effect of high altitude hypoxia on the postnatal development of rat testis: Histological and histometric study / H. M. Mohammed, M. D. Tingari // *Int. J. Morphol.* 2016. V. 34 № 2. P. 610-615.
116. Munaut, C. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast / C. Munaut, S.Lorquet, C. Pequeux, [et al.]. // *Hum Reprod.* 2008. № 6. P. 1407-15.
117. Murray, T.J. Human fetal testis: second trimester proliferative and steroidogenic capacities / T.J. Murray, P.A. Fowler, D.R. Abramovich, N. Haites, R.G. Lea // *J Clin Endocrinol Metab.* 2000. № 85. P. 4812–4817.
118. Nalbandian, A. Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse / A. Nalbandian, L. Dettin, M. Dym, N. Ravindranath // *Biology of Reproduction.* 2003. V. 69, № 3. P. 985–994
119. Obermair, A. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility/ A. Obermair, A. Obruca, M. Pöhl, [et al.]. // *Fertil. Steril.* – 1999. V. 72. № 2. – P. 269-275.
120. Odum, J. Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents / J. Odum, D. Creasy, J. Cartwright et al. // *ENV/JM/MONO.* 2009. Vol. 11, № 106.
121. Palatova, T.V. 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. V.7. № 2. – P. 1-5.
122. Palatova, T.V. 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.

123. Palatova, T.V. 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
124. Palatova, T.V. 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. - T. 10 - № 2 - C. 1-6.
125. Padmini, M.P. Prenatal histogenesis of human fetal testis / M.P. Padmini, B.N. Rao // Int. J Basic. Appl. Med. Sci. – 2012. V. 2. № 2. - P. 112-116.
126. Palermo, G.D. Treatment of male infertility / G.D. Palermo, J. Kocent, D. Monahan, [et al.]. // Methods Mol. Biol. – 2014. № 1154. P. 385-405.
127. Perrone, S. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases / S. Perrone, A. Santacroce, A. Picardi, G. Buonocore // World J Clin Pediatr. – 2016. V. 5 № 2. P. 172-81.
128. Pelletier, G. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs / G. Pelletier, M. El-Alfy // J Clin Endocrinol Metab. 2000. V. 85 № 12. P.4835-40.
129. Potter, C.P. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer / C.P. Potter, A.L. Harris // Br J Cancer. 2003. V. 89 № 1. P. 2-7.
130. Rae, M.T. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses / M.T. Rae, S.M. Rhind, P.A. Fowler // Reproduction. - 2002. - № 124. - P. 33-39.
131. Raso, M.G. immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation / M.G. Raso, C. Behrens, M. H. Herynk, S. Liu, L. Prudkin, N. C. Ozburn, D. M. Woods, X. Tang, R. J. Mehran, C. Moran, J. J. Lee, I. I. Wistuba // Clin Cancer Res. 2009. V. 15 № 17. P. 5359–5368.

132. Reyes, J.G. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology / J.G. Reyes, J.G. Farias, [et al.]. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. V. 2012. P. 1-15.
133. Rey, R.A. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis / R.A. Rey, M. Musse, M. Venara, [et al.]. // *Microscopy Research and Technique*. – 2009. – V.72. - № 11. - P. 787-795.
134. Sadlecki, P. The role of hypoxia-inducible factor-1a, glucose transporter-1, (GLUT-1) and carbon anhydrase ix in endometrial cancer patients / P. Sadlecki, M. Bodnar, M. Grabiec, [et al.]. // *BioMed Research International*. – 2014. - № 2014. - P. 1-11.
135. Sargent, K.M. VEGFA: Just one of multiple mechanisms for sex-specific vascular development within the testis? / K.M. Sargent, R.M. McFee, R.S. Gomes, A.S. Cupp // *J Endocrinol*. 2015. V.227 № 2. P. 31-50.
136. Sadeghi, M. R. Unexplained Infertility, the Controversial Matter in Management of Infertile Couples / M.R. Sadeghi // *J Reprod. Infertil*. – 2015. V. 16 № 1. P. 1-2.
137. Samson, M. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis / M. Samson ,F. V. Peale Jr, G. Frantz, N. Rioux-Leclercq, E. Rajpert-De Meyts, N. Ferrara // *J Clin Endocrinol Metab*. 2004. V.89 № 8. P. 4078-88.
138. Schneider, F. Comparison of enzymatic digestion and mechanical dissociation of human testicular tissues / F. Schneider, K. Redmann, J. Wistuba, [et al.]. // *Fertil. Steril*. – 2015. V. 104. № 2. – P. 302-311.
139. Steier, J.A. Human chorionic gonadotropin and testosterone in normal and preeclamptic pregnancies in relation to fetal sex / J.A.Steier, M. Ulstein, O.L. Myking // *Obstetrics gynecology journal*. – 2002. – V.100. - № 3. – P.552-556.



140. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene / G.L. Semenza, M.K. Neufeldt, S.M. Chi, [et al.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1991. - № 88. - P. 5680-5684.
141. Skakkebaek, N.E. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility / N.E. Skakkebaek, E. R-D. Meyts, G.B. Louis, [et al.]. // Physiol Rev. – 2016. V. 96 № 1. P 55-97.
142. Tarin, J.J. Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases / J.J. Tarin, M.A. García-Pérez, T. Hamatani, A. Cano // Reprod Biol Endocrinol. – 2015. V.13 № 31.
143. Thompson, L.P. Impact of oxidative stress in fetal programming / L.P. Thompson, Y.A. Hasan. // J Pregnancy. – 2012. V. 2012:582748.
144. Tian, R. VEGF/VEGFR2 signaling regulates germ cell proliferation invitro and promotes mouse testicular regeneration in vivo / R. Tian R., S.Yang, Y. Zhu, S. Zou, P. Li, J. Wang, Z. Zhu, Y. Huang, Z. He, Z. Li // Cells Tissues Organs. 2015. № 201. P.1–13.
145. Young, R.J. Immunohistochemical detection of tumour hypoxia / R.J. Young, A. Moller // Histology Protocols. – 2009. - № 611. - P. 151-159.
146. Verratti, V. Evidence that chronic hypoxia causes reversible impairment on male fertility / V. Verratti, F. Berardinelli, C.D. Giulio, [et al.]. //Asian J Androl. – 2008. V.10 № 4. P. 602-6.
147. Wahengbam, S. Development and morphogenesis of testis in human fetuses / S. Wahengbam, S. A. Singh, N. Damayanti // Journal of Anatomical Society of India. 2011. V. 60 № 2. P. 160-167.
148. Wang, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension / G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza // Proc Natl Acad Sci U S A. 1995. V. 92 № 12. P. 5510–5514.

149. Wu, W. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) / W. Wu, O. Shen, Y. Qin, [et al.]. // *PLoS One*. – 2010. V. 5 № 11. E.13884.
150. Zayed, A.E. Prenatal development of murine gonads with special reference to germ cell differentiation: a morphological and immunohistochemical study / A.E. Zayed, M.M. Abd-Elnaeim, S.K. Abd-Elghaffar, [et al.]. // *Andrologia*. – 2007. V. 39. № 3. – P. 93-100.
151. Ziello, J.E. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia / J.E. Ziello, I.S. Jovin, Y. Huang // *Yale J Biol Med*. 2007. V. 80 № 2 P. 51-60.
152. Zhang, R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) under hypoxia in placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy and its clinically pathological significance / R. Zhang, X.H. Pan, L. Xiao // *Int. J Clin. Exp. Pathol.* – 2015. V. 8. № 9. – P.11475-11479.
153. Zhao, W. Expression of Ki-67, Bax and p73 in patients with hilar cholangiocarcinoma / W. Zhao, B. Zhang, X. Guo // *Cancer Biomark.* – 2014. V. 14. № 4. – P 197-202.
154. Zhan, Y. Interplay between cytoplasmic and nuclear androgen receptor splice variants mediate castration resistance / Y. Zhan, G. Zhang, X. Wang, Y. Qi, S. Bai, D. Li, T. Ma, O. Sartor, E. K. Flemington, H. Zhang, P. Lee, Y. Dong // *Mol Cancer Res*. 2017. V. 15 № 1. P. 59–68.
155. Rani, V.U. Morphological and morphometric parameters of human ovaries from embryonic to menopausal age / V.U. Rani, V.S. Devi // *Int J Appl Basic Med Res*. 2011. V.1 № 2. P.89–92.