

«На правах рукописи»

Сизоненко Максим Леонидович

**РОЛЬ ХРОНИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ
ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ МАТЕРИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА В
НАРУШЕНИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАНОВЛЕНИЯ
МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Оренбург – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Брюхин Геннадий Васильевич

Официальные оппоненты:

Слесарева Елена Васильевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой морфологии медицинского факультета имени Т.З. Биктимирова Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Целуйко Сергей Семенович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии с биологией Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Янин Владимир Леонидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии, эмбриологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «16» июня 2015 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 208.066.04 Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 460000, Россия, г. Оренбург, ул. Советская, 6, зал заседаний диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, пр. Парковый, д.7 и на сайте www.orgma.ru

Автореферат разослан «...» ... 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Шевлюк Н.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время в России сложилась модель суженного воспроизводства населения, характеризующаяся существенным падением суммарного коэффициента рождаемости и снижением доли повторных рождений (Кулаков В.И., 2005). Сложившийся под влиянием социально-экономических и политических факторов уровень рождаемости отражает существенное изменение тенденций в репродуктивном поведении населения, а именно – сокращение количества семей, желающих иметь детей.

На состояние репродуктивного здоровья значимое влияние оказывает соматическое и психическое здоровье населения (Потемина Т.Е. и др., 2009). В то же время, за последние годы увеличилась доля заболеваний с хроническим рецидивирующим течением, большую тревогу вызывает увеличение заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), что происходит на фоне роста частоты токсикомании, наркомании, алкоголизма (Быков В.Л., 2000; Перфильева С.С., 2007; Кондашевская М.В. и др., 2012), а так же прогрессивного роста уровня загрязнения окружающей среды (Comhaire F. et al., 2007; Трошин В.Д., 2007). Угрожающие размеры приобретает рост числа заболеваний репродуктивной системы как у женщин фертильного возраста (Гимадеев М.М. и др., 1998; Игнатова Т.М., 2002; Либова Т.А. и др., 2003), так и у мужчин (Быков В.Л., 2000; Галимова Э.Ф. и др., 2010).

Среди факторов, определяющих беременность высокого риска, выделяют демографические, социально-экономические, материальные, плацентарные, родовые, неонатальные. При этом, одной из важнейших причин перинатальной патологии являются экстрагенитальные заболевания женщин детородного возраста, что во многом определяет увеличение числа осложнений беременности и родов (Тонкова-Ямпольская Р.В., 2002). В структуре экстрагенитальной патологии особое место занимают болезни гепатобилиарной системы.

Многочисленные клинические наблюдения указывают на частые осложнения течения беременности и родов у женщин с хроническим поражением гепатобилиарной системы (Фарбер Н.А., 1970; Михайленко Е.Т. и др., 1990).

В сочетании с нарушениями в репродуктивной системе все перечисленные факторы формируют контингент высокого акушерского и перинатального риска, т.е. материнской и перинатальной заболеваемости и смертности.

Всё вышеизложенное определяет рост неблагоприятных тенденций в состоянии здоровья новорожденных. Так, каждый третий рожденный ребенок имеет отклонения в состоянии здоровья; кроме того, отмечается высокий процент рождения недоношенных и незрелых детей, сохраняется высокий уровень младенческой и материнской смертности (Кулаков В.И., 2005).

Аntenатальный и ранний постнатальный возраст признаются одними из основных периодов онтогенеза, в которых закладываются основы здоровья в широком понимании этого термина. Не вызывает сомнения, что характер репродуктивной функции в молодом возрасте во многом детерминируется антенатальным периодом (Чехонацкая М.Л. и др., 2014).

Способность к оплодотворению – одна из главных для продолжения рода – в значительной мере зависит от состояния спермы (фертильности), а значит, от разнообразных средовых факторов, влияющих на состояние эякулята (Саяпина И.Ю., 2011; Потеемина Т.Е. и др., 2009; Айзикович Б.И. и др., 2010). Популяционные исследования, выполненные в разных странах, свидетельствуют, что на протяжении последних десятилетий наблюдается постоянное снижение качества спермы человека и животных (Булыгин К.В., 2009), и это не случайно, ведь миллионы лет живые организмы имели дело лишь со «знакомыми» сигналами среды. К середине же XX века «антропогенное давление» на биосферу приобрело глобальный характер, сопровождающийся массивным поступлением в среду обитания промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов. Обусловленные этим изменения физических и химических параметров среды, эффективная адаптация к которым не была выработана в процессе эволюции, стали представлять реальную угрозу здоровью человека, в том числе репродуктивному (Никитин А.И., 2009).

Заключая все вышесказанное, сохранение и восстановление репродуктивного здоровья выступают важнейшей медицинской задачей государственного значения, благополучное решение которой определяет возможность воспроизводства вида и сохранение генофонда. Известно, что если частота бесплодных браков достигает или превышает критический уровень 15%, то проблема бесплодия в этом случае приобретает государственное значение. Поэтому лечение бесплодия следует рассматривать как резерв рождения желанных детей и перспективного увеличения репродуктивного потенциала населения (Кулаков В.И., 2005).

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящего исследования явился анализ особенностей морфофункционального становления генеративного и эндокринного компартментов яичек у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследовать особенности становления процесса сперматогенеза у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза.
2. Изучить особенности морфофункционального становления эндокринного компартмента яичек у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.
3. Выявить специфические и неспецифические изменения со стороны генеративного и эндокринного компартментов мужских половых желез у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза.
4. Оценить фертильность потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза.

5. Исследовать особенности микроокружения развивающихся мужских половых клеток яичек у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза.
6. Установить роль аутоиммунного компонента, а так же активации процессов апоптотической гибели клеток и оксидативного стресса в нарушении морфофункционального становления мужских половых желез у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза.
7. Оценить стрессрезистентность генеративного и эндокринного компартментов яичек в условиях экспериментального влияния иммобилизационного стресса у потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Методология и методы исследования

Исследования проведения проведены на базе кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «ЮУГМУ» Минздрава России с 2006 по 2014 г. Для выполнения задач, поставленных в работе, проведен комплексный анализ результатов экспериментального исследования 1023 животных, составляющих потомство 281 самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза. Исходя из поставленных задач данного исследования, все экспериментальные животные были разбиты на 9 групп.

В первую группу выделены животные от интактных родителей (контрольная группа) – «К.» (133 животных из 31 помета). Во вторую группу вошли животные от матерей с хроническим токсическим поражением печени (токсическая группа) – «Т.» (100 животных из 28 пометов). В третью группу выделены животные от самок крыс с хроническим аутоиммунным поражением печени (аутоиммунная группа) – «А.» (107 животных из 34 пометов). В четвертую группу выделены животные от самок крыс с хроническим алкогольным поражением печени (алкогольная группа) – «Алк.» (127 животных из 40 пометов). В пятую группу выделены животные от самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени, вызванным введением супернатанта шестидневной культуры *E. coli* – «Геп. А» (92 животных из 25 пометов). В шестую группу вошли животные от самок крыс с хроническим экспериментальным D-галактозаминовым поражением печени – «Геп. В» (98 животных из 37 пометов). В седьмую группу выделены животные от самок крыс с хроническим экспериментальным лекарственным поражением печени, вызванным введением тетрациклина: Лекарственная 1 – «Тетр.» (97 животных из 20 пометов). В восьмую группу выделены животные от самок крыс с хроническим экспериментальным лекарственным поражением печени, вызванным введением парацетамола: Лекарственная 2 – «Пар.» (121 животных из 21 помета). В девятую группу выделены животные от самок крыс с хроническим экспериментальным мезенхимальным поражением печени – «Мез.» (116 животных из 24 пометов). Дополнительные группы составили животные контрольной (К-стресс) (12 животных из 6 пометов), алкогольной (Алк-стресс) (10 животных из 7 пометов) и

мезенхимальной (Мез-стресс) (10 животных из 8 пометов) групп, подвергшиеся воздействию иммобилизационного стресса.

Критерии отбора: половозрелые самки крыс линии Вистар интактной группы, половозрелые самки крыс линии Вистар с верифицированным морфологическими, биохимическими и иммунологическими методами поражением гепатобилиарной системы различного генеза, в том числе, токсическим, аутоиммунным, алкогольным, D(+)-галактозаминным, E.coli-индуцированным, лекарственным и мезенхимальным, а так же их потомство на 1-ый, 15-ый, 30-ый, 45-ый, 70-ый дни исследования.

При выполнении работы была определена многоэтапная программа исследования. Основной задачей первого этапа исследования явилось моделирование и верификация экспериментального поражения печени у половозрелых крыс-самок беспородной линии Вистар. На втором этапе исследования (основном) было произведено изучение морфофункциональных характеристик мужских половых желез потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза, а так же определены концентрации тестостерона, лютеинизирующего гормонов, ингибина В, провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF- α) в сыворотке крови экспериментальных животных, определены продукты перекисного окисления липидов в гомогенатах исследуемых органов и дана характеристика микроокружения развивающихся мужских половых клеток. На третьем (заключительном) этапе исследования дана оценка фертильности животных от потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Высокая степень достоверности результатов исследования, обоснованность выводов базируются на достаточном количестве экспериментальных животных, продуманном и взвешенном методическом и методологическом подходе к выполнению экспериментального исследования, использовании комплексного подхода для реализации поставленных задач, а так же ориентации, как на фундаментальные, так и современные лабораторные методы исследования и адекватной статистической обработке полученных результатов исследования с привлечением серьезного аналитического аппарата и методов математического моделирования, реализованных с использованием пакетов PAST (v.2.17 b) и KyPlot (v.2.0.15).

Материалы диссертации рассмотрены и обсуждены на конференциях, конгрессах и симпозиумах различного уровня, в том числе: международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных», (Троицк, 2009); международной конференции «Вопросы морфологии XXI века», к 80-летию со дня рождения профессора А.А. Клишова; III эмбриологическом симпозиуме Всероссийского научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов «ЮГРА-ЭМБРИО-2011. Закономерности эмбрио-фетальных морфогенезов у человека и позвоночных животных», (Ханты-Мансийск, 2011); XI

международном конгрессе международной ассоциации морфологов, (Самара, 2012); международной конференции «Реформування та розвиток науки: сучасні виклики» (Киев, 2013); международной научно-практической конференции «Наука, образование, общество: тенденции и перспективы» (Москва, 2013); всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов», посвященной памяти чл.-кор. АМН СССР профессора Ф. М. Лазаренко (Оренбург, 2013); региональной научно-практической конференции, посвященной 15-летию биологического факультета Челябинского государственного университета (Челябинск, 2013); всероссийском учебно-научном совещании «Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» (Санкт-Петербург, 2015).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования. Планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводилось совместно с научным консультантом, заведующим кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, д.м.н., профессором Брюхиным Г.В.

Анализ источников литературы, работа с экспериментальными животными, включая моделирование поражения печени различного генеза, обработка и интерпретация полученных данных, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялись соискателем лично. Подготовка публикаций по теме диссертации осуществлялась автором совместно с научным консультантом.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальная патология гепатобилиарной системы различного генеза у матери вызывает задержку и нарушение становления генеративного компартмента мужских половых желез потомства, находящее отражение в изменении суммарного количества сперматогенных клеток, а также их различных генераций, снижении концентрации и жизнеспособности зрелых мужских половых клеток, увеличении количества дегенеративных форм сперматозоидов.
2. Экстрагенитальная патология в виде хронического экспериментального поражения гепатобилиарной системы различного генеза вызывает изменения со стороны микроокружения клеток сперматогенного пласта, что находит отражение в изменении количества sustentоцитов, макрофагов (CD68⁺клеток), а также секреторной активности сертолиевого пласта по выработке гормона ингибина В.
3. Экспериментальная патология гепатобилиарной системы матери различного генеза вызывает нарушения со стороны эндокринного компартмента мужских половых желез потомства, проявляющееся в изменении количественных и качественных характеристик интерстициальных эндокриноцитов, изменении объема интерстициальной соединительной ткани, а также секреции андрогенов в яичке и гонадотропинов в гипофизе.
4. В нарушении морфофункционального становления генеративного и эндокринного компартментов яичек у потомства самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза участвуют иммунологические механизмы, связанные с повышением выработки антиспермальных антител, а также усиление

процессов липопероксидации, протекающей на фоне повышенной продукции провоспалительных цитокинов и активации апоптотической гибели развивающихся гамет.

5. Патология гепатобилиарной системы самок крыс различного генеза обуславливает снижение стрессоустойчивости со стороны структур генеративного и эндокринного компартментов яичек половозрелого потомства, что находит свое проявление в более выраженном, чем у животных групп сравнения, угнетении основных морфофункциональных показателей, характеризующих процессы сперматогенеза и стероидогенеза в мужских половых железах потомства.
6. Экспериментальная патология гепатобилиарной системы материнского организма обуславливает снижение показателей фертильности потомства, что находит свое проявление в преобладании нефертильной фракции мужских половых клеток в эякуляте придатка семенника, а также в уменьшении количества пометов у второго поколения животных, увеличении количества мертворожденных крысят и перераспределении полов в пометах второго поколения животных.

Научная новизна

Впервые на большом количестве адекватных экспериментальных моделей, воспроизводящих различные патогенетические формы поражения печени у матери (токсическую, аутоиммунную, аллергическую, алкогольную, лекарственную, мезенхимальную), установлены общие особенности морфофункционального становления основных компартментов яичек, проявляющиеся в неспецифических изменениях со стороны генеративного и эндокринного отделов мужских половых желез их потомства.

Выявлено нарушение фертильности мужских половых клеток у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы. Установлено, что в патогенезе выявленных нарушений помимо прямого токсического и опосредованного аутоиммунного влияния существенную роль играют процессы липопероксидации и активации апоптотической гибели половых клеток, что нашло отражение в изменении индексов окисления в гептановой и изопропаноловой фазах гомогената придатка яичка, а так же в увеличении количества клеток с повышенной активностью фермента (CPP32) – Caspase 3 и уменьшении количества bcl-2⁺ клеток.

В экспериментальных условиях показано, что генеративный компартмент мужских половых желез у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы различного генеза характеризуется сниженной стрессоустойчивостью. В ходе исследования было установлено, что эндокринный компартмент мужских половых желез у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы различного генеза также характеризуется сниженной стрессоустойчивостью.

Диссертационное исследование является фундаментальным. Полученные результаты содержат важные сведения о негативном влиянии патологии гепатобилиарной системы матери на процессы становления сперматогенеза и

стероидогенеза в яичках их потомства и, как следствие, нарушении их фертильности. Все вышеописанные изменения количественных и качественных показателей мужских половых гонад определили негативное влияние патологии гепатобилиарной системы материнского организма на биологические показатели во втором поколении у их потомства.

Результаты исследования расширяют представление о роли процессов активации липопероксидации, апоптотической гибели клеток и иммунологических факторов в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы у потомства самок крыс с патологией печени различного генеза, что может быть использовано для патогенетического коррекционного влияния еще в антенатальном периоде с целью сведения к минимуму последствий экстрагенитальной патологии матери.

Полученные в ходе исследования данные могут быть использованы для этиологически и патогенетически обоснованного планирования и ведения беременности и родов у матерей с патологией гепатобилиарной системы, а так же экспериментального обоснования необходимости выделения детей от матерей с патологией гепатобилиарной системы различного генеза в группу особого риска по развитию мужского бесплодия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационное исследование является фундаментальным. Полученные результаты содержат важные сведения о негативном влиянии патологии гепатобилиарной системы матери на процессы становления сперматогенеза и стероидогенеза в яичках их потомства и, как следствие, нарушении их фертильности, что нашло свое отражение в изменении количественных и качественных показателей сперматогенных и эндокринных клеток яичка, секретируемых ими гормонов, а так же в депрессивном изменении морфофункциональных показателей зрелых мужских половых клеток, определяющих оплодотворяющую способность спермы. Все вышеописанные изменения количественных и качественных показателей мужских половых гонад определили негативное влияние патологии гепатобилиарной системы материнского организма на биологические показатели во втором поколении у их потомства, что проявилось в изменении численности пометов, увеличении количества мертворожденных животных, более низких показателях выживаемости и перераспределения полов в пометах у подопытных животных.

Результаты исследования расширяют представление о роли процессов активации липопероксидации, апоптотической гибели клеток и иммунологических факторов в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы у потомства самок крыс с патологией печени различного генеза, что может быть использовано для патогенетически обоснованного коррекционного влияния еще в антенатальном периоде с целью сведения к минимуму последствий экстрагенитальной патологии матери.

Полученные в ходе исследования данные могут быть использованы для этиологически и патогенетически обоснованного планирования и ведения беременности и родов у матерей с патологией гепатобилиарной системы, а так же

экспериментального обоснования необходимости выделения детей от матерей с патологией гепатобилиарной системы различного генеза в группу особого риска по развитию мужского бесплодия.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты экспериментального исследования используются в учебном процессе, а так же научно-исследовательской деятельности кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского медицинского университета, кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии Челябинского государственного университета. Полученные результаты используются в клинико-морфологическом обследовании пациентов, обращающихся в ООО «Центр лечения бесплодия» ДНК-клиники, а так же в ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ (г. Екатеринбург).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 26 работ, в том числе 19 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 320 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных моделей и методов исследования, главы с описанием собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 526 источников, в том числе 252 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 76 рисунками, в том числе 36 микрофотографиями, 8 электронными микрофотографиями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования. Исследования проведения проведены на базе кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «ЮУГМУ» Минздрава России с 2006 по 2014 г. Для решения задач, поставленных в работе, проведен комплексный анализ результатов экспериментального исследования 1023 животных, составляющих потомство 281 самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза на разных сроках постнатального онтогенеза (на 1-ый, 15-ый, 30-ый, 45-ый и 70-ый дни). Сроки исследования согласуются с общепризнанным подразделением возрастных периодов у данной группы животных (Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. и др. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте. Киев: Вища шк., 1983. 383 с.): период новорожденности (1-5 дни), подсосный период (6-21 дни) и период полового созревания (22-50 дни).

Исследования проводили с учетом суточных и сезонных колебаний. Животные содержались в одинаковых условиях вивария и с одинаковым пищевым рационом. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986, ETS № 123).

Для достижения поставленной цели в ходе исследования на первом этапе произведено моделирование различных видов поражения гепатобилиарной системы. На втором этапе (базовом) была произведена оценка биологических показателей потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза, после чего при помощи общепринятых морфометрических критериев дана оценка генеративного компартмента мужской половой железы. Для подтверждения деструктивного характера сперматогенеза произведена оценка морфофункциональных характеристик эпидидимальных сперматозоидов. С целью установления степени влияния компонентов микроокружения на развивающиеся клетки сперматогенного пласта, произведено исследование качественных, количественных и функциональных показателей фолликулярных клеток, а так же макрофагов межуточной ткани яичка.

Эндокринный компартмент мужской половой железы оценивался при помощи унифицированных морфометрических методов. Так же для оценки эндокринной функции яичка были определены концентрации андрогенов и гонадотропных гормонов.

Для установления роли основных патогенетических звеньев в нарушении становления генеративного и эндокринного компартментов мужской половой железы произведено определение продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах исследуемых органов, а так же определены концентрации основных медиаторов воспаления в сыворотке крови экспериментальных животных и установлены уровни антиспермальных антител. На третьем (заключительном) этапе исследования дана оценка фертильности животных от потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Экспериментальные модели хронических поражений печени. Исходя из целей настоящего исследования, у лабораторных животных (самок) моделировались хронические поражения печени различной этиологии.

Модель хронического токсического поражения печени. Для создания модели хронического токсического поражения печени у крыс в качестве гепатотропного яда использовался галоидный углеводород – четыреххлористый углерод (CCl₄) (Алексеева И.Н. и др., 1991). Токсическое поражение печени у крыс создавалась путем подкожного введения 0,1 мл 40% раствора CCl₄ на растительном масле дважды в неделю в течение двух месяцев (Саркисов Д.С. и др., 1960).

Модель хронического аутоиммунного поражения печени. Хроническое аутоиммунное поражение печени у взрослых самок крыс массой 180-220 г создавалась путем длительной сенсибилизации гомологичным антигеном печени, приготовленным по общепринятой методике с адьювантом Фрейнда (Lohse A.W. et al., 1990). Полный цикл иммунизации продолжался 4 месяца. Первоначально печеночный антиген вводился подкожно с адьювантом Фрейнда (Lohse A.W. et al., 1990), а затем внутривенно в возрастающих дозах с интервалом в 3-4 дня (всего 7 инъекций). Повторную иммунизацию проводили через 10-15 дней от момента последней инъекции гомологичного печеночного антигена по сходной

схеме. В общей сложности было произведено 3 цикла иммунизации. Доза печеночного антигена, получаемого животными за полный курс иммунизации составляла 200 мг гомологичного печеночного антигена.

Модель хронического алкогольного поражения печени. Алкогольное поражение печени моделировалось путем поения взрослых половозрелых самок 15% раствором этилового спирта в течение трех месяцев, при этом питьевую воду животные не получали (Буров Ю.В., 1986). На первом этапе отбиралась группа самок крыс. Подопытным животным предлагались на выбор вода и 15% водный раствор этилового спирта. После чего поилку с водой убирали и оставляли только раствор этилового спирта. Все животные были разделены на 3 группы: «трезвенники» - отказываются пить раствор спирта даже при отсутствии воды; «потенциальные алкоголики» - предпочитают пить обычную воду, но при отсутствии таковой пьют спиртовой раствор; «алкоголики» - предпочитают пить спиртовой раствор. Животных, отказавшихся пить спиртовой раствор, выводили из эксперимента, а оставшихся животных продолжали поить в течение 3 месяцев.

Модель хронического экспериментального поражения печени, вызванного введением супернатанта шестидневной культуры E. coli. Экспериментальному животному (половозрелой самке) под эфирным наркозом в три участка печени – по одной с обеих сторон у основания мечевидного отростка и справа у края реберной дуги по срединно-ключичной линии вводили 0,2 мл супернатанта шестидневной культуры E.coli (штамм АТСС 25922) в разведении 1:4. В течение 24 часов после введения сенсibiliзирующей инъекции экспериментальные животные получали только воду. Разрешающая инъекция производилась через 24 часа путем введения в хвостовую вену супернатанта шестидневной культуры E.coli в разведении 1:4 из расчета 0,3 мл/кг массы тела животного. Возникающие морфологические и функциональные изменения, согласно данным литературы, подобны таковым при гепатите А (Подымова С.Д., 1993; Серов В.В. и др., 1989). Наиболее выраженные изменения выявлены на 3-7 сутки, поэтому на 4-ые сутки самок подсаживали к самцам для спаривания.

Модель хронического экспериментального D-галактозаминового поражения печени. Данную модель хронического поражения печени создавали путем внутрибрюшинного введения D(+)-галактозамина гидрохлорида («Sigma-G0500», США) на 0,9% растворе натрия хлорида в дозе 250 мг/кг массы тела животного. Возникающий при этом комплекс морфологических, иммунологических и биохимических изменений, согласно данным литературы, в определенной мере подобен таковому при вирусном гепатите В у человека (Сугрובה Н.П. и др., 1992).

Модель хронического лекарственного поражения печени, вызванного введением тетрациклина. Хроническое лекарственное поражение печени у самок крыс создавалось посредством зондового интрагастрального введения тетрациклина (Скакун Н.П. и др., 1982). Самкам крыс вводился тетрациклин в дозе 500 мг на 1 кг массы тела в течение пяти дней в виде взвеси на 1% крахмальном клейстере (Скакун Н.П. и др., 1984).

Модель хронического лекарственного поражения печени, вызванного введением парацетамола. Хроническое лекарственное поражение печени у самок крыс создавалось посредством зондового интрагастрального введения парацетамола. Самкам крыс вводился парацетамол в дозе 2500 мг на 1 кг массы тела в течение двух дней в виде взвеси на 1% крахмальном клейстере (Венгеровский А.И. и др., 2005; Еремина Е.Ю., 2011).

Модель хронического экспериментального мезенхимального (гранулематозного) поражения печени. Для создания мезенхимального (гранулематозного) поражения печени у крыс была использована щелочная фосфатаза из бычьей сыворотки («Sigma – P5521», США). Половозрелым самкам крыс до беременности однократно внутривенно вводили раствор данного препарата в физиологическом растворе, объемом 0,1 мл, содержащий дозу 20 ЕД активности (Маянский Д.Н. и др., 1990).

Экспериментальная модель иммобилизационного стресса. С целью оценки адаптационных возможностей репродуктивной системы применялась нагрузка в форме иммобилизационного стресса. Для этого 70-дневных крысят помещали в камеру Когана, где животные находились в положении лежа на спине (Брюхин Г.В. и др., 1998). Первоначально иммобилизация продолжалась с 10.00 до 15.00 часов. Затем, после двухчасового отдыха животные вновь помещались в камеру Когана на ночь. После отдыха животные в 17.00 часов снова подвергались иммобилизации до утра, после чего производился забой экспериментальных животных.

Методы исследования.

Описание методов исследования. Исходя из поставленных задач, нами использовались биологические, морфологические, морфометрические, физиологические, электронно-микроскопические, иммуногистохимические, иммунологические, биохимические методы и статистические методы исследования.

Биологические методы исследования семенника. Для оценки физиологической зрелости потомства животных контрольной и опытной групп использовали следующие показатели: число живых родившихся плодов, число случаев фетальной смерти, численность помета, пол, весовые параметры новорожденных. Кроме того, оценивали состояние жизнеобеспечивающих систем потомства экспериментальных животных. С этой целью определяли показатель выживаемости животных в период раннего постнатального онтогенеза (к исходу 2-го и 15-го дня после рождения), динамику нарастания массы тела, тимуса, селезенки и подколенных лимфатических узлов. Кроме того, оценивали степень физиологической зрелости потомства, регистрируя время наступления определенных этапов физического развития животных каждого помета: открытие глазных щелей и ушных отверстий, появление первичного и вторичного шерстного покровов, прорезывание резцов (Брюхин Г.В. и др., 2004).

Морфологические методы исследования семенника. Отпрепарованные семенники после взвешивания фиксировали в жидкости Буэна (пикриновая кислота, 40% раствор формалина, ледяная уксусная кислота в соотношении

15:5:1, дальнейшее уплотнение материала производилось через заливку в парафин. Гистологические срезы толщиной 4-5 мкм, изготовленные на санном и ротационном микротоме окрашивали гематоксилином и эозином, железным гематоксилином по Гендейнгайну, галлоцианином по Эйнерсону (Лили Р., 1980).

Морфометрические методы исследования семенника. Оценку особенностей структурно-функционального становления генеративной и эндокринной функции семенника потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени производили с использованием общепринятых критериев (Боровская Т.Г. и др., 2000; Шевлюк Н.Н. и др., 2010).

Оценка генеративной функции семенника.

Основными параметрами, определяющими величину канальцев, служат их средний диаметр и средняя площадь поперечного сечения. Диаметр и площадь поперечного сечения извитых семенных канальцев определялся с помощью автоматизированной системы захвата и обработки изображения Motic VA 400 (объектив 10, окуляр 10, инструментальное увеличение 10x10) с программным обеспечением Видео-Тест Морфология v.5.0, позволяющим в полуавтоматическом режиме производить морфометрические измерения по стандарту шкалы-микрометра (цена деления 10 мкм). Измерения проводили в 50 поперечных срезах семенных извитых канальцев. Расчет вели на 1 срез извитого семенного канальца.

Цитологический анализ зародышевых клеток. Прежде всего, нами производился подсчет суммарного количества сперматогенных клеток в извитых семенных канальцах. Оценке подлежали 30 строго поперечных срезов извитых семенных канальцев, в каждом из которых осуществлялся суммарный подсчет клеток сперматогенного эпителия.

Согласно данным литературы (Иванова Л.А. и др., 1990), более чувствительным морфологическим критерием активности сперматогенеза является содержание сперматогоний в извитых семенных канальцах. Нами производился количественный анализ сперматогоний различных степеней зрелости (А, П, Б) (Бурнашева С.А. и др., 1982). Также производился подсчет первичных и вторичных сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов в 30-ти взятых наугад строго поперечных срезах извитых семенных канальцев. Цитологический анализ клеток сперматогенного эпителия производился при увеличении окуляра x10, объектива x40.

Одним из показателей чувствительности сперматогенеза к действию различных неблагоприятных факторов является количество канальцев со слущенным эпителием (Гольтберг Е.Д. и др., 1995). Нами производился анализ 100 поперечных срезов извитых семенных канальцев при увеличении окуляра x10, объектива x40, среди которых выявлялись канальцы с клетками, потерявшими морфофункциональную связь с клетками своего клона и «слущенными» в просвет канальца. О сохранности процессов сперматогенеза косвенно можно судить по количеству в семенных извитых канальцах гигантских сперматогенных клеток, в том числе сперматогенных клеток с разрушенными ядрами (дегенеративные формы клеток сперматогенного эпителия) (Боровская

Т.Г. и др., 2000). Нами просматривались 30 поперечных срезов семенных извитых канальцев при увеличении окуляра $\times 10$, объектива $\times 40$, в которых определялись гигантские сперматогенные одно- или многоядерные клетки, чаще всего, утратившие связь с клетками своего клона, с дегенеративными изменениями (фрагментированные и пикнотизированные ядра). Производился подсчет суммарного количества таких клеток.

Для выявления незаметных невооруженному глазу изменений предложен ряд индексов. Одним из таких важнейших показателей состояния сперматогенного пласта является индекс сперматогенеза (Черток В.М. и др., 1998). Fogg a. Cowing (1951) (Саноцкий И.В. и др., 1978) предложили разделить сперматогенный эпителий на 4 слоя: 1) сперматогонии; 2) сперматоциты; 3) сперматиды; 4) сперматозоиды. Исходя из этого, нами просматривались 100 канальцев, в каждом из которых производился подсчет количества слоев сперматогенного эпителия. Индекс сперматогенеза высчитывали по формуле $I = \sum a / A$, где I – индекс сперматогенеза, a – количество слоев сперматогенного эпителия, обнаруженных в каждом канальце; A – количество подсчитанных канальцев (Саноцкий И.В. и др., 1979).

Оценку сперматогенного пласта осуществляли так же, подсчитывая количество клеток Сертоли и клеточный индекс Сертоли. Клеточный индекс Сертоли определяли путем дифференцированного подсчета зародышевых клеток и фолликулярных клеток. Общее число зародышевых клеток различных типов (сперматогонии, первичные и вторичные сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды) делили на общее число клеток Сертоли в тех же полях. Подсчет клеток производился при увеличении окуляра $\times 10$, объектива $\times 40$.

Оценка физиологических параметров сперматозоидов. Зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, разрезая его вдоль в среде дозированного количества 5% раствора глюкозы (в объеме 1 мл), предварительно подогретой до температуры 37°C . (Муравлева Л.Е. и др., 2007). Далее отрезком отмытой резиновой трубки эпидидимис активно перемещали в течение 2-х минут для освобождения от части сперматозоидов. Затем в камере Горяева производился подсчет сперматозоидов с учетом характера их подвижности. Подсчет производился в течение первого часа через каждые 15 минут, а затем через 30 минут до 240 минуты включительно. Полученную взвесь эпидидимальных сперматозоидов содержали в термостате при температуре 37°C . Оценка подвижности проводилась по общепринятой методике 4-х бальной оценки сперматозоидов по характеру подвижности, рекомендованную ВОЗ в 1999 году (Молнар Е., 1969): 0- неподвижные (погибшие), 1- «дергающиеся» (колебательное, местное движение, когда имеется движение хвоста, но не происходит перемещения сперматозоидов), 2- слабоподвижные (манежное или круговое прогрессивное движение, при котором сперматозоиды вращаются вокруг своей головки или по небольшому кругу) и 3- прогрессивноподвижные (прямолинейное поступательное движение со спиральным вращением вокруг своей оси) сперматозоиды. Индекс подвижности сперматозоидов определялся как

отношение фертильных (прогрессивноподвижных и слабоподвижных) и нефертильных (дергающихся и неподвижных) сперматозоидов.

Определение кислотной резистентности сперматозоидов проводили в чашке Петри, в которую помещали 1,5 мл суспензии. Затем по каплям прибавляли 0,1 N раствор соляной кислоты до полной остановки движения сперматозоидов, которая наблюдалась под микроскопом. При этом регистрировали реакцию pH (с помощью pH-метра с микроэлектродом) (Саноцкий И.В. и др., 1979).

Для определения осмотической резистентности сперматозоидов изготавливалась шкала растворов хлорида натрия от 1,5 до 3,75% с интервалом 0,25% (штатив с пробирками). На предметные стекла с лунками помещали по 0,05 мл суспензии и вносили поочередно из каждой пробирки равное количество раствора, устанавливая концентрацию, при которой под микроскопом наблюдается полная остановка сперматозоидов (Саноцкий И.В. и др., 1979).

Для оценки патологических форм сперматозоидов смешивали часть полученной суспензии с 1%-ым раствором эозина Y в соотношении 1:10, затем спустя 30 минут изготавливали мазки, которые после просушивания на воздухе фиксировали метиловым спиртом и подвергали микроскопии (Wyrobek A.J. et al., 1975). Из расчета на 200 клеток подсчитывалось процентное содержание сперматозоидов с дефектами головки шейки, средней части и хвоста (Kuriyama K. et al., 2004).

Для оценки жизнеспособности сперматозоидов на предметном стекле смешивали каплю гомогената с каплей 0,1%-го эозина Y на изотоническом растворе NaCl с помощью стеклянной палочки (Björndahl L. et al., 2004). Полученный препарат микроскопировали, подсчитывая на 200 клеток количество мертвых (окрашенных) сперматозоидов. Кроме того, в полученной эпидидимальной суспензии определялось суммарное количество сперматозоидов в единице объема (1мл) (Тиктинский О.Л., 1999).

Оценка инкреторной активности семенника. Морфометрические критерии, характеризующие функциональную активность интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига), включают определение их количества, соотношения различных морфофункциональных типов этих клеток, размера клеток и размера ядра (Шевлюк Н.Н., 1997).

Приступая к оценке эндокринной активности семенника, в первую очередь, оценивалась абсолютная и относительная площадь интерстициальной соединительной ткани (Шевлюк Н.Н., 1997).

Оценка относительной площади интерстициальной ткани производилась с помощью автоматизированной системы захвата и обработки изображения Motic BA 400 (объектив 10, окуляр 10, инструментальное увеличение 10x10) с программным обеспечением Видео-Тест Морфометрия v.5.0: вычислялось отношение площади интерстициальной ткани в поле зрения к площади семенника, попавшего в данное поле зрения. Расчеты производились на 100 полей зрения.

Состояние инкреторной функции семенника находит свое отражение в суммарном количестве интерстициальных эндокриноцитов и соотношении

различных морфофункциональных типов этих клеток. Клетки Лейдига подлежали количественной оценке в 30 полях зрения при увеличении окуляра $\times 10$, объектива $\times 40$ из расчета на один строго поперечный срез извитого семенного канальца.

По классификации Sniffen, R.C. (1950) (Sniffen R.C., 1950) принято выделять 5 типов клеток Лейдига, при этом, клетки типа В и С являются наиболее секреторно активными, в то время как клетки незрелого типа А и инволюционирующего типа Е не участвуют в продукции андрогенов. В «общей» популяции клеток Лейдига определялись активные (В, С, D) и неактивные (А, Е) элементы (Портной А.С., 1970). Также определялся «индекс активности» интерстициальных эндокриноцитов семенника, представляющий собой отношение активных клеток Лейдига к неактивным, подсчитанных в общих 30-ти полях зрения.

Активность интерстициальных эндокриноцитов коррелирует, по мнению некоторых исследователей (Францкевич Н.Н., 1973) с величиной их ядер.

Измерение диаметра ядер клеток Лейдига проводили в полуавтоматическом режиме с помощью системы компьютерного анализа изображений «ВидеоТест» — Морфология, версия 5.0 на 100 взятых произвольно интерстициальных эндокриноцитов.

Оценка эндокринной функции семенника методом твердофазного иммуноферментного анализа. Об эндокринной функции семенника 45-ти дневных крысят от самок с экспериментальным хроническим поражением печени судили на основании концентрации в сыворотке крови мужского полового гормона – тестостерона. Также производился анализ концентрации в сыворотке крови экспериментальных животных лютеинизирующего гормона гипофиза.

Определение концентрации гипофизарного лютеинизирующего гормона и тестостерона семенников производили методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя наборы реактивов Dia. Metra S.r.l. (Италия), стероид ИФА-тестостерон (Санкт-Петербург).

Электронно-микроскопические методы исследования интерстициальных эндокриноцитов семенника. Материал для электронно-микроскопического исследования подготавливался по общепринятой методике (Карупу В.Я., 1984). После декапитации животных семенники отпрепаровывались и взвешивались. В нескольких местах надрезалась белочная оболочка, после чего орган помещался на 20-30 мин. в глутаровый альдегид. После дофиксации из левого семенника «извлекался кусочек» необходимых размеров (с булавочную головку) при помощи лезвия и помещался вновь в глутаровый альдегид (первичная фиксация). Вторичная фиксация осуществлялась 4% раствором OsO_4 в течение двух часов. Последующая заливка материала осуществлялась в синтетические эпоксидные смолы ЭПОН-АРАЛДИТ.

При помощи ультрамикротомы готовились полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивались 1% раствором метиленового синего (Карупу В.Я., 1984). Ультратонкие срезы контрастировали по методу Рейнольдса уранилацетатом свинца и цитратом свинца. Электронные микрофотографии изготавливались при использовании трансмиссионного электронного микроскопа Libra-120 («Carl Zeiss

& МТ», Германия) с диапазоном увеличения 1200-20000. При этом производилось изучение ультраструктурных характеристик интерстициальных эндокриноцитов с использованием программы «Digital Morphology», позволяющей оценить количественные показатели исследуемых органоидов.

Иммуногистохимические методы исследования.

Иммуногистохимическую реакцию проводили с гистологическими срезами от правого семенника. Иммуногистохимически выявлялись следующие антигены: Ki67 (маркер клеточной пролиферации), CD68 (маркирует клетки линий моноцитов-макрофагов), bcl-2 (антиапоптотическая активность), CPP32 (Cysteine Protease Protein / Caspase-3) (проапоптотическая активность) (Рисунок 26-27).

Иммунологические методы исследования.

Определение уровня медиаторов межклеточного взаимодействия. Для оценки уровня медиаторов межклеточного взаимодействия (IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF- α) в сыворотке крови использовали метод иммуноферментного анализа (Газиева И.А. и др., 2008). Методика постановки реакции и оценка полученных результатов проводились в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей реагентов (цитокины - «FlowCytomix Multiple Analyte Detection» (Австрия). Детекцию результатов исследования (медиаторов межклеточного взаимодействия) осуществляли на проточном цитометре «Navius» фирмы «Beckman Coulter» (США).

Определение уровня антиспермальных антител в сыворотке крови.

Антиспермальные антитела в сыворотке крови определялись методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы Sperm-antibody-ELISA, Bioserv на ИФА-фотометре Multiskan (Германия).

Определение продуктов перекисного окисления липидов в гомогенате семенников. Для изучения содержания продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах семенников был выбран экстракционно-спектрофотометрический метод с отдельной регистрацией продуктов ПОЛ в гептановой и изопропаноловой фазах липидного экстракта (Бабанин А.А. и др., 2009). В качестве экстрагента использовали смесь гептана и изопропилового спирта, что позволило разделить липидную вытяжку на фазы различной полярности путем добавления раствора соляной кислоты (рН=2). При этом, верхняя (гептановая) фаза концентрирует большую часть триацилглицеридов (резервных липидов), в то время как водноспиртовая фаза содержит основное количество мембранных фосфолипидов (структурных липидов). Гептановый слой экстракта декантировали, затем в освобожденный от гептановой фазы экстракт добавляли NaCl для освобождения водноспиртовой части липидной вытяжки от воды и растворенных в ней примесей. Изопропаноловую фазу декантировали, избегая ее контаминации водной фазой. При приготовлении оптических контролей (растворов сравнения) вместо биологического образца было использовано эквивалентное количество среды для суспендирования тканей (0,5 мл 0,1% ЭДТА в 0,9% NaCl).

Спектрофотометрия каждой фазы липидного экстракта осуществлялась в кварцевых кюветах толщиной 1 см против соответствующего оптического

контроля. Измерения экстинкций производилась при трех длинах волны: 220, 232 и 278 нм с использованием спектрофотометра СФ-46 ЛОМО (СССР, 1988). Поглощение при 220 нм соответствует нисходящему плечу максимума оптической плотности изолированных двойных связей и отражает степень ненасыщенности липидов. Значения экстинкций при 232 нм и 278 нм являются функцией содержания первичных и вторичных, соответственно, продуктов ПОЛ в липидном экстракте (Волчегорский И.А. и др., 2000). Аналитическим подходом к определению конечных продуктов ПОЛ является флюоресцентная детекция данных соединений. Таким образом, нами производилось дополнительное определение конечных продуктов ПОЛ при длине волны 400 нм. Результаты выражали в виде единиц индексов окисления диеновых ($E_{232/220}$), кетодиеновых и сопряженных триеновых ($E_{278/220}$), шиффовых ($E_{400/220}$) оснований.

Статистические методы исследования. В ходе статистического анализа рассчитывали показатели описательной статистики (среднее арифметическое, ошибка среднего) и проводили сравнение средних значений. 95%-ный доверительный интервал (95% ДИ) рассчитывали с помощью процедуры Bootstrap ($N=9\ 999$). С учетом небольшого количественного состава групп экспериментальных животных для оценки достоверности исследования использовались непараметрические методы (коэффициент Манна-Уитни) (Реброва О.Ю., 2002). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Расчеты и графические построения выполнены в пакетах PAST (v.2.17 b) и KyPlot (v.2.0.15). Для оценки сочетанного действия патологии гепатобилиарной системы матери и иммобилизационного стресса применялся двухфакторный дисперсионный анализ, что выявить не только различие между группами, но и выявить значимые взаимодействия между данными факторами. Проверка распределений на нормальность проводилась с помощью критерия Колмагорова-Смирнова (Холлендер М. и др., 1983). Проверка распределений на однородность дисперсий производилась с помощью критерия Levene (Levene H., 1960). Нормализацию данных, распределенных с отклонением от нормального распределения производили с помощью преобразования Вох-Сох (Sakia R.M., 1992).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка биологических показателей экспериментальных животных. В ходе исследования было установлено, что у самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза имеет место нарушение репродуктивной функции. Так, например, у 58% животных с токсическим поражением печени, 49% животных с аутоиммунным поражением, 53% животных с алкогольным поражением, 54% животных с (D^+)-галактозаминным, 51% животных с E-coli-индуцированным и 56% животных с мезенхимальным поражением печени отмечены нарушения эстрального цикла, выразившиеся в развитии стойкого диэструса или эструса. При этом у интактных животных случаев нарушения эстрального цикла не наблюдалось.

При подсадке к самцам самок в период эструса на 1-ые сутки спаривание происходило у всех животных группы контроля, а у самок опытных групп 1/2 -

1/3 случаев. При развившейся беременности у подопытных животных показатели внутриутробной смертности существенно превышали таковые в контроле. Высокие показатели антенатальной смертности у экспериментальных животных, в определенной мере коррелируют с процентом выживаемости животных к исходу 2-х и 15-х суток после рождения. Число выживших крысят в помете подопытных животных в первые две недели после рождения резко снижается в сравнении с контролем. У потомства самок крыс с хроническим поражением печени значимо снижалось число новорожденных в помете. Вместе с тем, сравнительный анализ пометов по полу позволил выявить у подопытных животных более выраженное преобладание женских особей и более заметное снижение числа особей мужского пола по сравнению с контролем.

Согласно современным представлениям (Брюхин Г.В., 1995), снижение динамики прироста массы тела животного в период раннего постнатального периода является одним из признаков физиологической незрелости, так как большинство этапов физического развития соотносится с этим параметром. Установлено, что у животных опытных групп имеет место замедление по сравнению с контролем процессов накопления массы тела после рождения. Так, у крысят контрольной группы имеет место постепенное увеличение после рождения массы тела, достигающей наибольшего значения к концу периода полового созревания (45-й день). Такая же закономерность выявлена и у подопытных крысят. При этом на большинстве сроков исследования масса тела у опытных крысят снижена по сравнению с контролем. Эти данные согласуются с показателями ежедневного прироста массы тела. Таким образом, ежедневный прирост массы тела животных опытных групп в период раннего постнатального онтогенеза оказался существенно меньше, что и обусловило более низкие весовые параметры в исследуемые сроки.

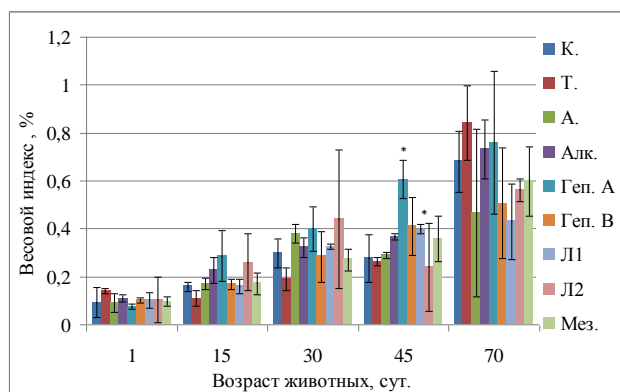
Таким образом, анализируя полученные результаты можно заключить, что хроническое поражение гепатобилиарной системы различной этиологии у самок крыс отражается на жизнеспособности и развитии их потомства и, по терминологии James O. Mason (1991) (James O.M., 1991), формировании «старта здоровья», что может существенно менять способность организма к адаптации, его реактивность и резистентность.

Одним из наиболее важных показателей физиологической зрелости животных является их жизнеспособность. Показатель выживаемости потомства самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза оказался значительно ниже, чем в контроле. Исходя из всего вышеизложенного, у самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различного генеза рождается физиологически незрелое потомство.

Характеристика весовых параметров мужских половых желез экспериментальных животных. Наиболее чувствительным показателем весовых параметров органа является его весовой (генеративный) индекс (Мухачева С.В. и др., 2006), представляющий собой отношение массы органа к массе тела, выраженное в процентах. В ходе исследования было установлено (Рисунок 1 А), что исследуемый показатель у животных опытных групп в различные сроки

постнатального онтогенеза проявляет себя неоднозначно. Так, с течением постнатального онтогенеза имеет место увеличение числа групп со сниженным весовым индексом исследуемого органа, что может быть связано с истощением процессов адаптации репродуктивной системы и организма в целом (Селье Г., 1960) и половых желез в условиях активации их основных функциональных систем, начиная с периода полового созревания.

(А)



(Б)

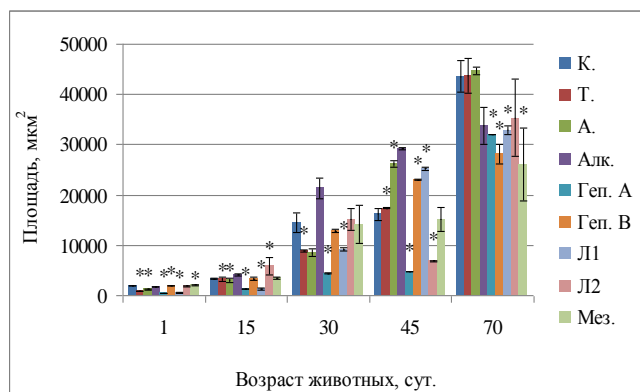


Рисунок 1 – Весовой индекс семенников экспериментальных животных (А) и площадь поперечного сечения извитых семенных канальцев (Б)

* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

В тоже время, общепризнанным является, что весовые параметры семенника коррелируют с качественными показателями его сперматогенной и эндокринной функций (Latif R. et al., 2008), поэтому выявленные изменения могут косвенно свидетельствовать, по крайней мере, об их изменении.

Анализ генеративной функции семенников экспериментальных животных. О генеративной функции семенников экспериментальных животных мы судили на основании показателей диаметра и площади поперечного сечения извитых семенных канальцев, индекса сперматогенеза, среднего числа сперматогоний, сперматоцитогаммы с использованием клеточного индекса Сертоли, цитологического профиля сперматогенеза, количества канальцев со слущенным эпителием и числа гигантских сперматогенных клеток.

Характеристика величины извитых семенных канальцев. Анализ величины площади поперечного сечения извитых семенных канальцев позволил констатировать, что у экспериментальных животных интактной и опытных групп исследуемый показатель после рождения постепенно увеличивается и достигает максимума к периоду половой зрелости (70-е сутки). При этом обращает на себя внимание (Рисунок 1 Б), что в течение первых 30-ти суток после рождения площадь поперечного сечения извитых семенных канальцев у животных большинства опытных групп снижена по сравнению с контролем. В то же время, к периоду полового созревания (45-е сутки) площадь поперечного сечения

извитых семенных канальцев у большинства опытных групп увеличивается, а к периоду половой зрелости (70-е сутки) вновь снижается.

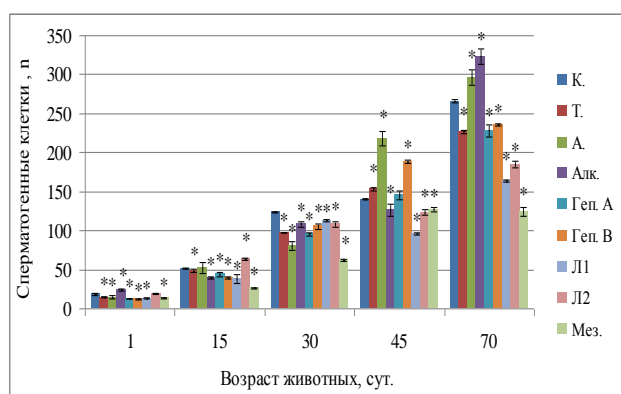
Зарегистрированные изменения размеров извитых семенных канальцев являются важнейшими количественными показателями, указывающими на угнетение процессов сперматогенеза, что находит свое отражение и в данных литературы (Саяпина И.Ю. и др., 2013).

Характеристика сперматогенных клеток. Сперматогенный пласт экспериментальных животных оценивали, прежде всего, с учетом суммарного содержания сперматогенных клеток, в том числе сперматогоний различной степени зрелости, сперматоцитов, сперматид, сперматозоидов, а так же индекса сперматогенеза. Кроме того, производился подсчет числа извитых семенных канальцев со слущенным эпителием и количества гигантских сперматогенных клеток.

Анализ суммарного содержания сперматогенных клеток в семенных извитых канальцах позволил установить (Рисунок 2 А), что исследуемый показатель у животных опытных групп на большинстве сроков исследования уступает таковым показателям в контроле. В то же время, стоит отметить, что увеличение количества сперматогенных клеток, наблюдаемое преимущественно в периоде полового созревания и половой зрелости может свидетельствовать о развитии компенсационных процессов в извитых семенных канальцах, направленных на восполнение числа апоптотически погибающих клеток.

Более чувствительным морфологическим критерием активности сперматогенеза, согласно данным литературы (Ухов Ю.И. и др., 1983), является содержание сперматогоний в извитых семенных канальцах.

(А)



(Б)

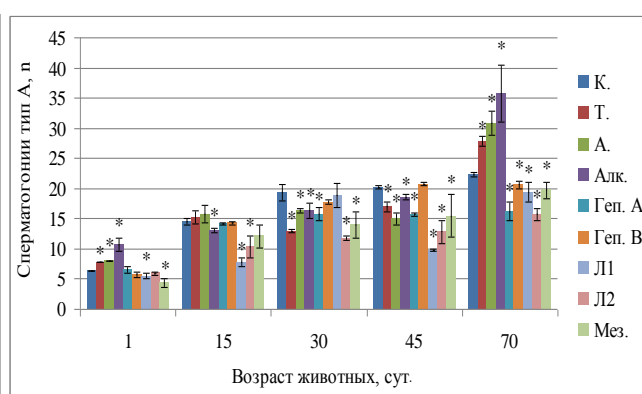


Рисунок 2 – Суммарное содержание сперматогенных клеток в извитых семенных канальцах (А) и динамика изменения количества сперматогоний «А» в извитых семенных канальцах (Б)

* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Нами производился подсчет как общего числа сперматогоний, так и числа сперматогоний «А» (сперматогонии ранней степени зрелости), сперматогоний «Р»

(сперматогонии промежуточного типа) и сперматогоний «В» (сперматогонии конечной стадии зрелости) (Бурнашева С.А. и др., 1982).

(А)

(Б)

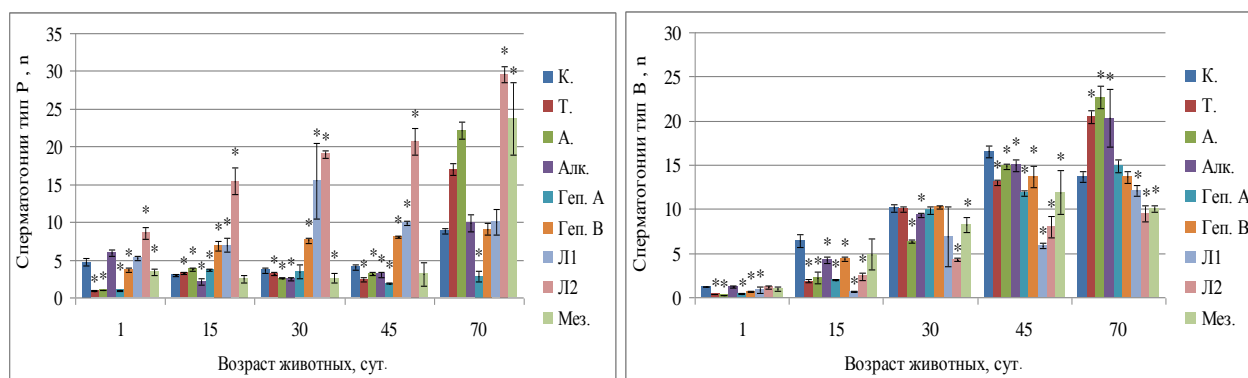


Рисунок 3 – Динамика изменения количества сперматогоний «Р» в извитых семенных канальцах (А) и сперматогоний «В» (Б) в извитых семенных канальцах * – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

В ходе исследования было установлено, что у большинства подопытных животных на ранних сроках исследования имеет место уменьшение количества исследуемых клеток в извитых семенных канальцах. При этом в периоде половой зрелости у большинства исследуемых групп наблюдается обратная закономерность.

Наибольший интерес представляют показатели, отражающие содержание сперматогоний различной степени зрелости. Установлено (Рисунок 2 Б), что на большинстве сроков исследования количество сперматогоний «А» в извитых семенных канальцах подопытных животных уступает таковому в контроле.

Анализ содержания сперматогоний «Р» в извитых семенных канальцах установил (Рисунок 3 А), что в ходе постнатального онтогенеза их количество у животных интактной группы снижается вплоть до 30-х суток наблюдения, после чего отмечается увеличение численности последних, достигающее максимума к периоду половой зрелости. В то же время, у большинства подопытных крысят наблюдается обратная закономерность, заключающаяся в увеличении численности сперматогоний Р после рождения.

Анализ содержания зрелых сперматогоний в извитых семенных канальцах позволяет свидетельствовать об увеличении численности исследуемых клеток у животных всех экспериментальных групп с течением постнатального развития (Рисунок 3 Б). В то же время, у животных опытных групп на большинстве сроков исследования имеет место уменьшение количества сперматогоний «В» в извитых семенных канальцах по сравнению с контролем.

Анализ содержания первичных и вторичных сперматоцитов в извитых семенных канальцах экспериментальных животных позволил выявить следующую закономерность (Рисунок 4, 5). Количество первичных и вторичных

сперматоцитов у животных всех экспериментальных групп после рождения постепенно увеличивается и достигает максимума к периоду половой зрелости (70-е сутки наблюдения). В то же время, с течением постнатального онтогенеза у большинства подопытных животных отмечается снижение исследуемого показателя.

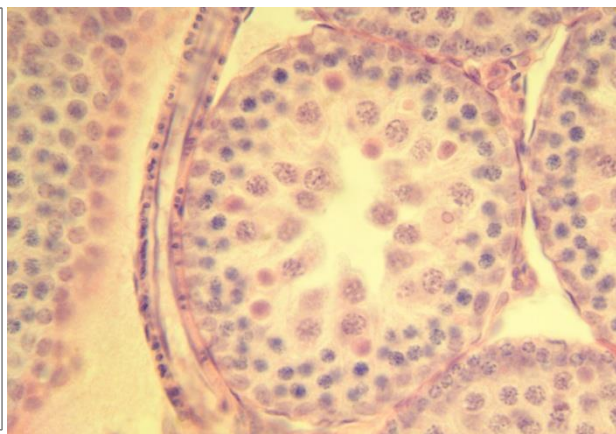
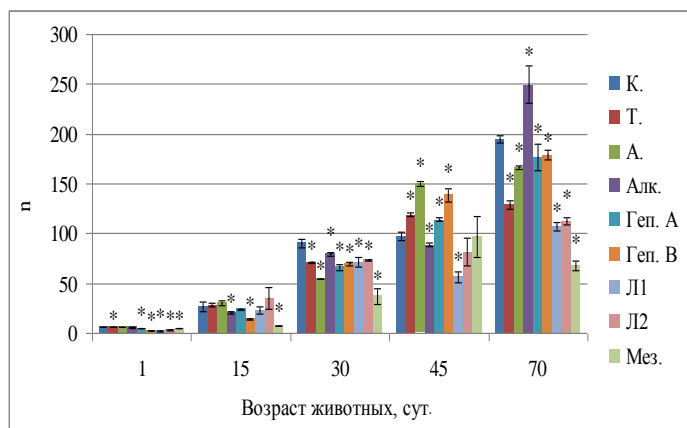


Рисунок 4 – Динамика изменения содержания сперматоцитов в извитых семенных канальцах

* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Рисунок 5 - Сперматоциты в составе сперматогенного пласта. Окраска: гематоксилин и эозин. Микрофото. Ув. 400 (об.х40; ок.х10)

В постнатальном периоде у экспериментальных животных интактной и опытных групп в извитых семенных канальцах также происходит изменение содержания сперматид. Установлено, что у всех экспериментальных животных в период новорожденности сперматиды в извитых семенных канальцах отсутствуют и появляются в небольшом количестве на 15-й день наблюдения. В то же время, обращает на себя внимание, что у большинства подопытных групп количество сперматид в извитых семенных канальцах снижено по сравнению с контролем.

Сперматозоиды в извитых семенных канальцах экспериментальных животных выявляются только с периода полового созревания (45-й день исследования), что соответствует литературным данным (Ruwanpura S.M. et al., 2008). При этом, показатель количества сперматозоидов в извитых семенных канальцах большинства подопытных животных на 45-е сутки наблюдения уступает аналогичному показателю в контроле. На 70-й день наблюдения подобная тенденция сохраняется. Полученные результаты в целом соответствуют современным представлениям о том, что количество спермиев коррелирует с количеством сперматид (Martin-du Pan R.S. et al., 1993). В то же время, наблюдаемое некоторое снижение количества сперматозоидов по отношению к количеству сперматид может свидетельствовать о большей чувствительности

периода спермиогенеза к действию различных повреждающих факторов, в том числе пренатального стресса (Черток В.М. и др., 2001).

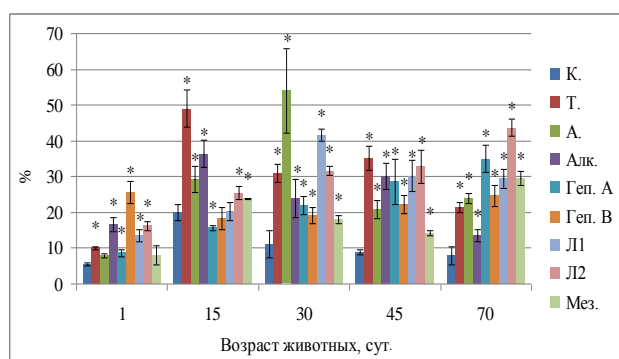
Кроме того, для оценки сперматогенного пласта нами производился подсчет числа канальцев со слущенным эпителием (Рисунок 6 А). Установлено, что на всех сроках исследования количество канальцев со слущенным эпителием у животных большинства опытных групп увеличено по сравнению с контролем.

Увеличение количества канальцев со слущенным эпителием является существенным признаком дегенеративных процессов в сперматогенном пласте (Бугаева Л.И. и др., 2006).

Так же нами производился подсчет гигантских сперматогенных клеток (Боровская Т.Г. и др., 2000) (Рисунок 6 Б).

Гигантские сперматогенные клетки представляют собой дегенеративные формы клеток сперматогенного пласта, чаще сперматид, реже сперматоцитов и сперматогоний, подвергающихся апоптотическому разрушению (Mortons D. et al., 1986).

(А)



(Б)

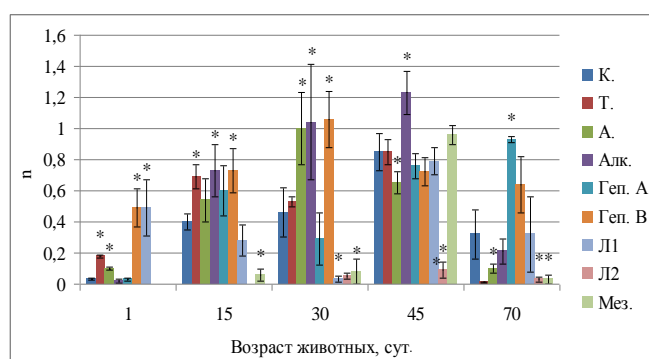


Рисунок 6 – Количество канальцев со слущенным эпителием (А) и гигантских сперматогенных клеток в извитых семенных канальцах (Б)

* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Как видно из Рисунка 6 Б, у большинства животных от матерей с хроническим поражением печени имеет место увеличение данного показателя по сравнению с контролем, что согласуется с данными литературы (Боков Д.А. и др., 2009).

Одним из важнейших критериев состояния сперматогенного пласта является индекс сперматогенеза, представляющий собой отношение количества слоев сперматогенных клеток, обнаруженных в каждом извитом семенной канальце, к количеству подсчитанных канальцев. Прежде всего, обращает на себя внимание, что у всех экспериментальных животных после рождения происходит постепенное увеличение индекса сперматогенеза, достигающего наибольшего уровня к 70-му дню постнатальной жизни. При этом, на большинстве сроков исследования индекс сперматогенеза у подопытных животных снижен по сравнению с контролем.

Анализ морфофункциональных параметров эпидидимальных сперматозоидов экспериментальных животных. Оценку сперматозоидов производили с учетом общего их содержания, характера жизнеспособности, двигательной активности, кислотной и осмотической резистентности, а так же количества атипичных форм (Kuriyama K. et al., 2004).

В ходе исследования было установлено, что у животных большинства подопытных групп содержание эпидидимальных сперматозоидов снижено по сравнению с контролем.

Одним из наиболее важных критериев, коррелирующих с показателем фертильности животных, является жизнеспособность сперматозоидов. В ходе исследования было установлено, что у животных опытных групп имеет место увеличение количества мертвых сперматозоидов в гомогенате придатков мужских половых желёз по сравнению с интактными животными.

Анализ содержания патологически измененных форм сперматозоидов позволил констатировать увеличение количества дегенеративных форм зрелых сперматогенных клеток в опытных группах в сравнении с контрольными показателями. Анализируя полученные результаты, можно заключить, что у животных от матерей с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза в периоде половой зрелости наблюдается изменение как количественных, так и качественных характеристик зрелых мужских половых клеток.

Согласно рекомендованной ВОЗ классификации, фертильную фракцию половых клеток составляют быстрые прогрессивноподвижные и слабоподвижные сперматозоиды.

Установлено (Рисунок 7 А), что у всех подопытных крысят содержание прогрессивноподвижных клеток уже на первой минуте исследования снижено по сравнению с интактными крысятами.

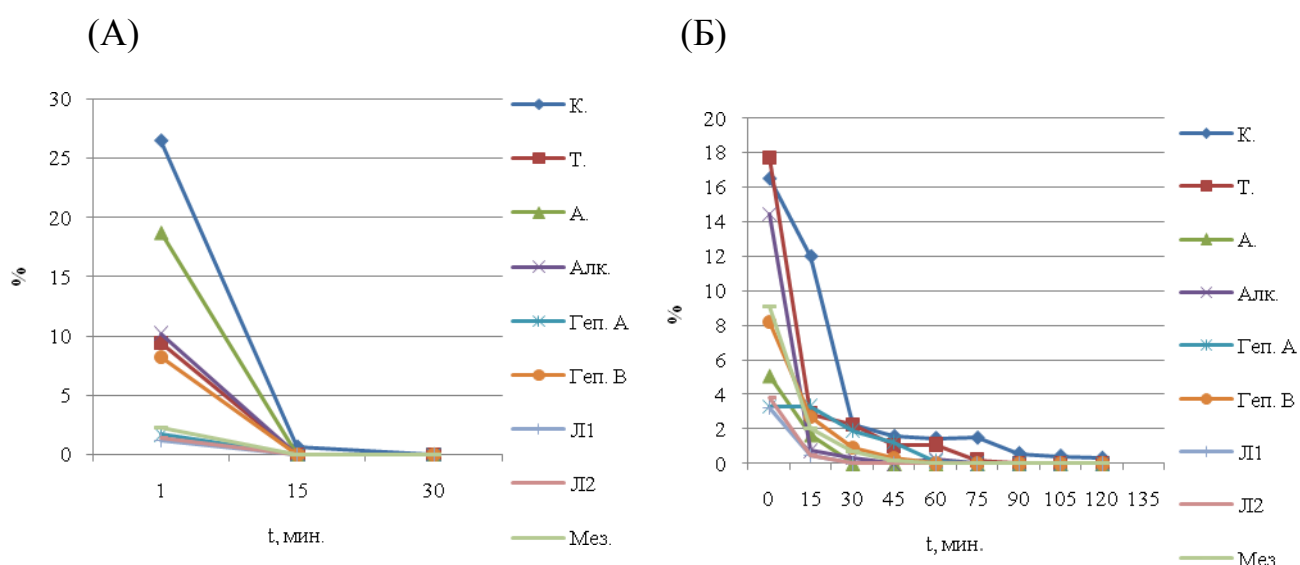


Рисунок 7 - Количество быстрых прогрессивноподвижных (А) и слабоподвижных (Б) эпидидимальных сперматозоидов в гомогенате придатка семенника экспериментальных животных

В то же время, на 15-ой минуте исследования у подопытных животных прогрессивноподвижные сперматозоиды в гомогенате придатка семенника отсутствуют.

Анализируя данные, полученные в ходе исследования о содержании слабоподвижных эпидидимальных сперматозоидов в гомогенате придатка семенника можно констатировать (Рисунок 7 Б), что количество слабоподвижных сперматозоидов у подопытных животных постепенно снижается к 120-ой минуте наблюдения до уровня более низкого, чем в контроле.

Нефертильную фракцию мужских половых клеток составляют дергающиеся и неподвижные сперматозоиды. В ходе исследования было установлено, что у животных интактной группы непрогрессивноподвижные сперматозоиды сохраняются до 240 минуты наблюдения. В то же время, у животных опытных групп на большинстве сроков исследования количество сперматозоидов, характеризующихся непрогрессивным характером движения, снижено по сравнению с контролем.

Анализ содержания неподвижных сперматозоидов в гомогенате придатка семенника позволил констатировать, что у большинства подопытных животных количество неподвижных сперматозоидов превышает таковые значения в контроле на всех сроках исследования.

Одним из показателей фертильности семенной плазмы является индекс подвижности эпидидимальных сперматозоидов, представляющий собой отношение фертильных (прогрессивноподвижных и слабоподвижных) и нефертильных (непрогрессивноподвижных и неподвижных) сперматозоидов.

Установлено, что индекс подвижности сперматозоидов у животных опытных групп снижен по сравнению с контролем.

Исследование показателей кислотной и осмотической резистентности спермиев позволяет произвести оценку устойчивости биологических мембран исследуемых клеток к воздействиям факторов среды (França L.R. et al., 2005). В ходе эксперимента было установлено, у животных, рождённых от матерей с хронической патологией гепатобилиарной системы, кислотная и осмотическая резистентность клеток оказалась снижена по сравнению с интактными животными.

Результаты, полученные в ходе исследования физиологических параметров эпидидимальных сперматозоидов, с одной стороны, могут свидетельствовать в пользу раннего развития повреждений в сперматогенном эпителии семенников потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза, а с другой стороны, учитывая данные об изменении кислотной и осмотической резистентности клеток (Кузьминов А.В., 2013), о развитии патологических процессов в придатках семенников на более поздних этапах онтогенеза экспериментальных животных (Булыгин К.В., 2009).

Таким образом, исходя из результатов исследования и данных литературы, выявленное существенное угнетение морфофункциональных показателей эпидидимальных сперматозоидов у потомства самок крыс с экспериментальной

патологией гепатобилиарной системы различного генеза может служить прямым отражением нарушения их фертильности.

Иммуногистохимические маркеры пролиферативной и апоптотической активности клеток сперматогенного пласта у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени. С целью определения пролиферативной активности сперматогенных клеток иммуногистохимически определялись в общей популяции Ki-67⁺ клетки.

Установлено (Рисунок 8), что у большинства животных опытных групп количество клеток, вступивших в митоз, на большинстве сроков постнатального онтогенеза увеличено по сравнению с контролем.

Одним из компонентов микроокружения мужских половых клеток, играющим важную роль в реализации генеративной функции мужских половых желез, являются макрофаги (CD68⁺-клетки). Установлено (Рисунок 9), что количество CD68⁺ клеток у животных интактной группы превышает таковые значения животных опытных групп.

Одним из наиболее чувствительных маркеров, характеризующих уровень апоптотической активности как соматических, так и половых клеток, является антиген bcl-2, относящийся к группе генов-регуляторов апоптоза. Установлено, что, количество bcl-2⁺ клеток у животных опытных групп уступает таковым показателям в контроле.

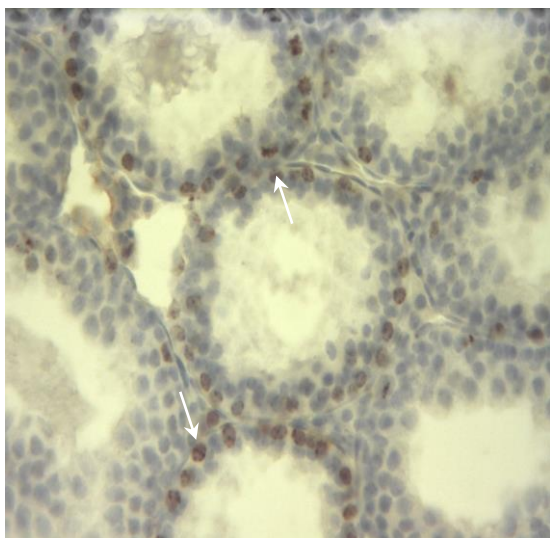


Рисунок 8 – Ki-67⁺ клетки в извитых семенных канальцах 45-дневных крысят мезенхимальной группы. Микрофото. Увеличение: 400 (об.х40; ок.х10)

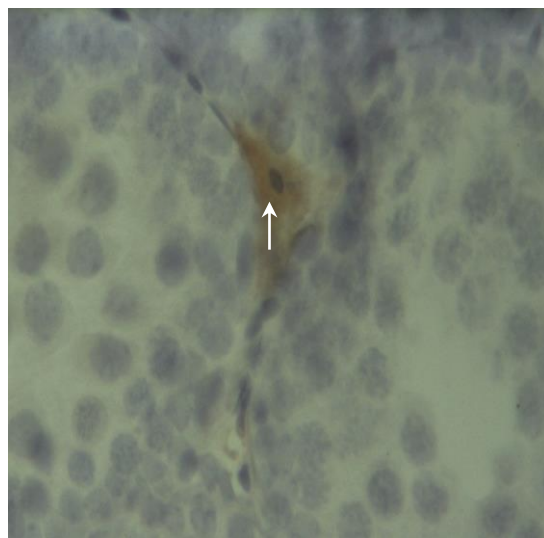


Рисунок 9 – CD68⁺ (макрофаг) в интерстициальной соединительной ткани яичка 45-дневного животного лекарственной группы. Микрофото. Увеличение: 1000 (об.х100; ок.х10)

Для определения количества клеток, вступивших в апоптоз, выявлялся специфический маркер активного апоптоза - Caspase-3 (CPP32). Установлено, что количество клеток с регистрируемой апоптотической активностью у животных подопытных групп значительно превышает таковые значения в контроле. Так,

если у животных интактной группы интенсивность иммуногистохимической реакции составила 2,8, то у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза исследуемый показатель колебался в пределах 5,5 – 8,7 у.е.

Исходя из всего вышеизложенного можно заключить, что у животных с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза имеет место угнетение процесса сперматогенеза, что достоверно подтверждается как общепринятыми морфометрическими методами, так и специфическими иммуногистохимическими методами исследования. В то же время, установленное в ходе исследования уменьшение количества $Vcl-2^+$ клеток и увеличение количества клеток с активным ферментом Caspase-3 (CPP32), свидетельствует о ведущей роли апоптоза в патогенезе выявленных нарушений.

Характеристика фолликулярных клеток. Установлено (Рисунок 10, 11), что у большинства подопытных животных количество фолликулярных клеток в извитых семенных канальцах снижено по сравнению с контролем.

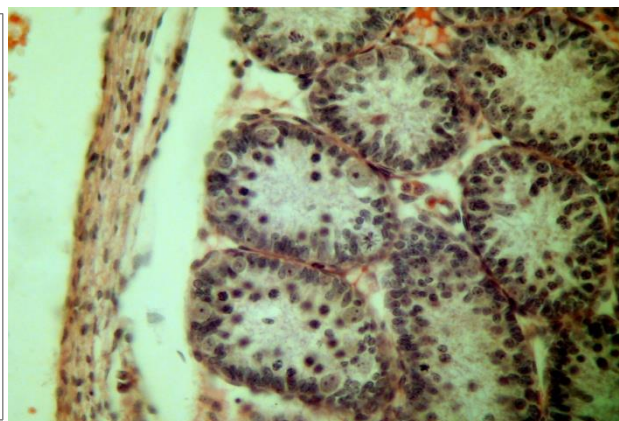
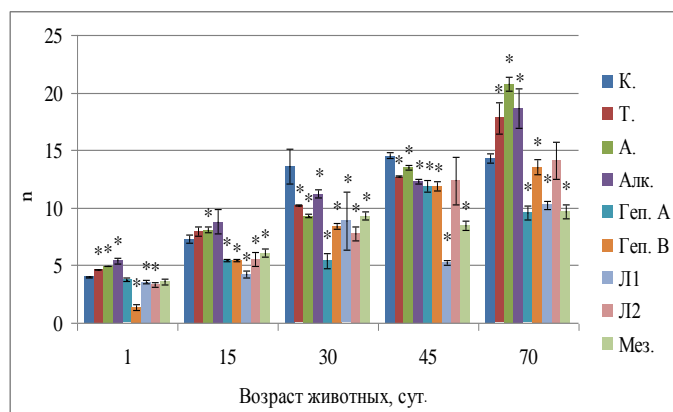


Рисунок 10 – Содержание клеток Сертоли в извитых семенных канальцах

* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Рисунок 11 - Суспендоциты в составе сперматогенного пласта. Окраска: гематоксилин и эозин. Микрофото. Ув. 400 (об.х40; ок.х10)

С целью оценки функционального состояния суспендоцитов было произведено определение уровня гормона ингибина В, являющегося маркером активности фолликулярных клеток в сыворотке крови экспериментальных животных. Установлено, что концентрация исследуемого гормона у животных опытных групп значительно превышает таковые значения в контроле.

Таким образом, выявленные в ходе исследования изменения в характере секреторной активности суспендоцитов согласуются с данными литературы (Hu Y.A. et al., 2002) и свидетельствуют о выраженном депрессивном характере сперматогенеза у животных от матерей с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Характеристика эндокринного компартмента мужских половых желез потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени.

Оценка морфологических параметров эндокриноцитов производилась с учетом общепринятых критериев (Шевлюк Н.Н., 1997), в том числе оценивалась площадь интерстициальной соединительной ткани, общее количество эндокриноцитов, соотношение различных морфофункциональных типов клеток Лейдига, размер ядер гландулоцитов, а так же характер ультраструктурных особенностей эндокриноцитов.

Измерение относительной площади интерстициальной ткани проводили в полуавтоматическом режиме с помощью системы компьютерного анализа изображений «ВидеоТест» — Морфология, версия 5.0. Установлено, что у большинства подопытных животных, на разных сроках онтогенеза имеет место увеличение относительной площади интерстициальной соединительной ткани. Обращает на себя внимание, что наиболее выраженное развитие интерстициальной ткани у животных опытных групп наблюдается в периоде половой зрелости. Подобные изменения могут быть связаны с активацией процесса фибриллогенеза, ведущего к склеротизации органа.

Для оценки интерстициальных клеток семенников производился подсчет числа эндокриноцитов из расчета на один поперечный срез извитого семенного канальца, а так же оценивалось содержание различных их морфофункциональных типов (активных и неактивных). Установлено, что на большинстве исследуемых сроков суммарное количество эндокриноцитов у животных опытных групп увеличено по сравнению с группой контроля.

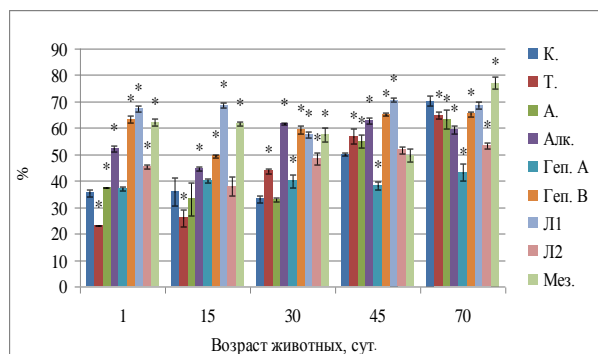
Наиболее важным показателем, отражающим функциональное состояние клеток Лейдига, является содержание среди них активных (В, С, D) и неактивных (А, Е) типов. Установлено, что у всех экспериментальных животных относительное количество активных эндокриноцитов в интерстициальной ткани после рождения постепенно увеличивается, достигая максимума к периоду половой зрелости. При этом, у животных опытных групп на большинстве сроков исследования количество активных эндокриноцитов превышает аналогичные показатели в контроле (Рисунок 12 А). В то же время, количество неактивных эндокриноцитов у животных большинства опытных групп снижено по сравнению с контролем (Рисунок 12 Б).

Увеличение числа активных эндокриноцитов до уровня более высокого, чем в контроле, наблюдаемое у животных опытных групп находит свое отражение и в изменении индекса активности интерстициальных эндокриноцитов, отражающего отношение числа активных эндокриноцитов к неактивным.

Изменения в интерстициальном компартменте мужской половой железы подтверждаются данными электронно-микроскопического и иммунологического исследования. Так, у половозрелых подопытных животных удается обнаружить повышение внутриклеточной активности главных стероидпродуцирующих клеток (клеток Лейдига), нашедшее отражение в увеличении количества канальцев гладкого эндоплазматического ретикулума, митохондрий с тубуло-

везикулярными кристами, увеличении размеров ядерных пор и активации рибосомального транспорта через кариолемму, увеличении количества липидных включений и секреторных гранул в цитоплазме.

(A)



(Б)

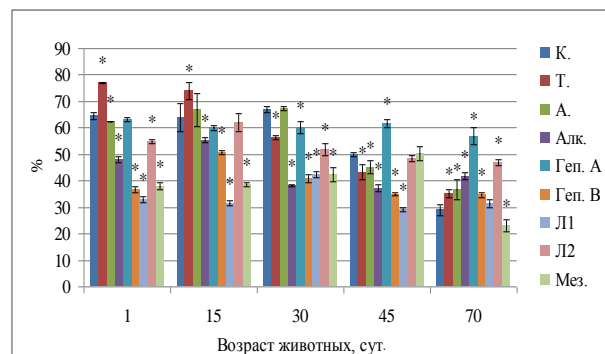


Рисунок 12 - Содержание активных (А) и неактивных (Б) клеток Лейдига в семенниках экспериментальных животных (%)

* – результаты статистически достоверны ($p < 0,05$)

Таким образом, данные электронно-микроскопического исследования свидетельствуют об активации в период полового созревания эндокринного компартмента мужских половых желез у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза.

Концентрация тестостерона и лютеинизирующего гормона в сыворотке крови экспериментальных животных. Установлено, что концентрация сывороточного тестостерона у животных большинства опытных групп превышает аналогичные значения в контроле. Активация эндокринного компартмента мужских половых желез, проявляющаяся в усилении выработки тестостерона, в определенной мере, коррелирует с содержанием гипофизарного лютеинизирующего гормона в сыворотке крови экспериментальных животных.

Медиаторы межклеточного взаимодействия в сыворотке крови экспериментальных животных. Одним из звеньев в патогенезе нарушения становления процесса сперматогенеза и стероидогенеза является повышение уровня провоспалительных цитокинов в различных биологических средах (Тарасова М.Н. и др., 2007).

Установлено, что в сыворотке крови подопытных крысят уровень $IL-1\beta$, $IL-2$, $IL-8$, $TNF-\alpha$ изменен по сравнению с группой контроля. При этом, если в период новорожденности у подопытных животных всех групп имеет место увеличение уровня содержания большинства исследуемых провоспалительных цитокинов (исключение составил $IL-8$), то в период наступления половой зрелости у подопытных крысят выявлено повышение уровня концентрации только $TNF-\alpha$.

Продукты перекисного окисления липидов в гомогенате яичек экспериментальных животных.

Используя экстракционно-спектрофотометрический метод с отдельной регистрацией продуктов ПОЛ в гептановой и изопропаноловой фазах липидного экстракта, было установлено, что у животных алкогольной (Алк.) группы имеет место повышение содержания в семенной жидкости первичных (диеновых конъюгатов), вторичных (кетодиенов и сопряженных триенов) и конечных (шиффовых оснований) как гептановой, так и изопропаноловой фаз. В то же время, у животных лекарственной Л2 (Пар.) и аутоиммунной (А.) групп имеет место снижение содержания первичных, вторичных и конечных продуктов гептановой фазы и повышение содержания молекулярных продуктов перекисного окисления липидов изопропаноловой фазы. Снижение индексов окисления в гептановой фазе свидетельствует об ограничении процесса липопероксидации, а снижение индексов окисления ниже уровня в контроле говорит о развитии у животных лекарственной и аутоиммунной группы оксидативного стресса. У животных алкогольной и аутоиммунной группы наблюдается тенденция к увеличению свободнорадикального окисления, не достигшая достоверности, как следствие увеличения индекса окисления первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов), вторичных продуктов (кетоновые соединения, альдегиды), а так же конечных продуктов (шиффовых оснований) в изопропаноловую фазу.

Результаты, полученные в ходе изучения особенностей свободнорадикального окисления липидов в семенниках, позволяют сделать заключение о том, что моделирование хронической патологии печени у самок крыс способствует развитию окислительного стресса в семенниках половозрелого потомства.

Антиспермальные антитела в сыворотке крови экспериментальных животных. Согласно современным данным литературы (Охоботов Д.А. и др., 2007), одной из существенных, но не до конца изученных причин бесплодия в браке является иммунологический фактор. В его основе лежит наличие у пациентов антител к гаметам. Обобщая все вышеизложенное, и учитывая важную роль аутоиммунного фактора в патогенезе нарушения становления основных морфофункциональных компонентов мужской половой железы, в ходе комплексного экспериментального исследования было произведено определение уровня антиспермальных антител в сыворотке крови половозрелых экспериментальных животных (70-ый день исследования). Установлено, что у животных всех опытных групп уровень антиспермальных антител превышает значения в контроле (Рисунок 13).

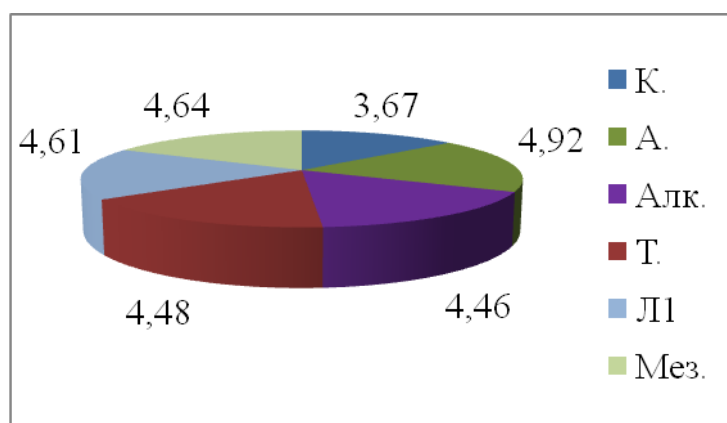


Рисунок 13 – Антиспермальные антитела в сыворотке крови половозрелых экспериментальных животных

Таким образом, результаты, полученные в ходе данной серии исследования подтверждают многочисленные данные литературы о важной роли аутоиммунного компонента в патогенезе развития мужской инфертильности.

Оценка стресс-резистентности экспериментальных животных.

Для изучения диапазона стрессоустойчивости половой системы экспериментальных животных воспроизводилась модель иммобилизационного стресса (Лобанова Н.Н. и др., 1986), в соответствии с данными литературы, согласно которым стрессовое иммобилизационное воздействие представляет собой один из самых распространенных в реальной жизни смешанных стрессовых влияний (Галимова Э.Ф. и др., 2010).

Результаты, полученные в ходе исследования подвергались обработке с помощью программных комплексов IBM SPSS Statistics 20.0 и PAST 3.01 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа, что позволило констатировать не только различие между группами, но и установить связь между причинными факторами.

Характеристика стрессоустойчивости генеративного компонента яичек экспериментальных животных.

Установлено, что у подопытных животных генеративный и эндокринный аппарат яичек проявляет повышенную чувствительность к действию стрессовых факторов, в частности, у подопытных крысят, подвергнутых стрессовому воздействию, имеет место более выраженное уменьшение диаметра извитых семенных канальцев, уменьшение суммарного количества клеток в сперматогенном пласте, увеличение количества канальцев со слущенным эпителием и числа гигантских сперматогенных клеток и, как следствие, снижение концентрации зрелых сперматозоидов с угнетением их двигательной активности. Вместе с тем, иммобилизационный стресс обуславливает более выраженное, чем в контроле, снижение у подопытных крысят числа клеток Сертоли и концентрации в сыворотке крови ингибина.

Важным показателем морфофункциональной зрелости мужской репродуктивной системы является концентрация сперматозоидов, показатели которой свидетельствуют о фертильности биологического вида. В ходе

экспериментального исследования было констатировано снижение концентрации сперматозоидов у подопытных животных на фоне иммобилизационного стресса. Отмечено, что выраженное влияние оказывают как сами причинные факторы, так и их потенцирующее воздействие друг на друга.

Еще одним важным критерием фертильности эякулята является показатель подвижности мужских половых клеток. Установлено, что у животных опытных групп иммобилизационный стресс вызывает угнетение концентрации быстрых прогрессивноподвижных и слабоподвижных сперматозоидов, составляющих наиболее важную с точки зрения оплодотворяющей способности фертильную фракцию половых клеток. Исходя из всего вышеизложенного, можно заключить, что патология гепатобилиарной системы материнского организма и иммобилизационный стресс, воздействуя на биологические структуры, как самостоятельно, так и, в большей степени, совместно, потенцируя влияние друг друга, оказывают негативное воздействие на морфофункциональные показатели мужской репродуктивной системы. Всё вышеизложенное позволяет говорить о подавлении стрессорезистентности ряда показателей в генеративном компартменте мужской половой железы.

Использование двухфакторного дисперсионного анализа позволило установить наличие сочетанного негативного влияния патологии печени матери и иммобилизационного стресса на процессы сперматогенеза.

Наряду с этим, моделирование иммобилизационного стресса вызывает существенные изменения со стороны эндокринного компартмента мужских половых желез, что находит свое отражение в уменьшении суммарного количества эндокринных клеток и их активной популяции, секретирующей большее, чем в контроле количество тестостерона, происходящее на фоне увеличения количества неактивных эндокриноцитов. Двухфакторный дисперсионный анализ позволил установить наличие синергичной связи при влиянии повреждающих факторов на эндокринный компартмент яичка.

Использование двухфакторного дисперсионного анализа с целью установления характера взаимного влияния повреждающих факторов друг на друга позволило констатировать, что в большинстве случаев он носит характер синергии, то есть взаимного отрицательного влияния друг на друга.

Опираясь на полученные в ходе исследования результаты и данные литературы можно констатировать, что у животных, рожденных от матерей с хронической патологией гепатобилиарной системы различного генеза отмечается снижение стрессорезистентности как со стороны генеративного, так и эндокринного компартментов мужской половой железы, что является дополнительным риском по развитию мужского бесплодия.

Характеристика фертильности экспериментальных животных. Интегральным критерием эффективности процесса сперматогенеза и его чувствительности к действию различных неблагоприятных факторов является показатель фертильности биологического вида. Фертильность экспериментальных животных определялась посредством подсаживания к подопытным половозрелым самцам

интактных самок, после чего рассчитывался процент наступления беременности, общей численности пометов и количество мертворожденных животных.

В ходе исследования установлено, что у животных опытных групп процент наступления беременности был значительно снижен по сравнению с группой контроля, так же имеет место снижение численности пометов и их жизнеспособности, а так же увеличение числа мертворожденных крысят и изменении соотношения полов во втором поколении экспериментальных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема бесплодия, рассматриваемая в рамках физиологии и патологии репродуктивной функции человека, - важная составляющая часть современной медицины. В настоящее время во всем мире проводятся широкомасштабные исследования, направленные на изучение причин нарушения репродуктивной функции человека и разработку методов, восстанавливающих фертильность.

Согласно данным литературы, в последние годы в большинстве развитых стран мира, в том числе и в России, отмечается устойчивая тенденция к снижению показателей активности сперматогенеза у мужчин (Вафин Р.Г. и др., 2010). Описанные изменения исследователи (Быков В.Л., 2000) связывают с разрушающим влиянием на мужские половые железы многочисленных физических, химических и бытовых факторов как в антенатальном, так и в постнатальном периодах онтогенеза. В то же время, несмотря на многочисленные исследования прямого негативного влияния повреждающих факторов на процессы сперматогенеза и стероидогенеза в мужских половых железах, работ, касающихся исследованию воздействия токсикантов и других неблагоприятных факторов на процессы антенатального и раннего постнатального становления основных компартментов яичка, встречается не так уж и много.

В связи с вышеизложенным, была предпринята попытка комплексной оценки характера влияния экстрагенитальной патологии, а именно болезней гепатобилиарной системы материнского организма на процессы антенатального и постнатального становления основных функциональных систем мужской половой железы, а так же вскрытия ведущих патогенетических звеньев, ответственных в развитии предполагаемых нарушений.

В этом плане для выявления общих и специфических закономерностей нарушений структурно-функционального становления яичек у потомства подопытных животных были использованы различные экспериментальные варианты воспроизведения патологии печени, моделирующие распространенные в клинике цитолитический, смешанный и аутоиммунный синдромы.

Результаты, полученные в ходе первой серии исследования находятся в полном соответствии с ранее полученными данными о наличии физиологической незрелости у потомства матерей с хроническим поражением гепатобилиарной системы, что нашло отражение в уменьшении числа новорожденных особей в пометах, снижении числа выживших крысят в пометах экспериментальных животных, более высоких показателях внутриутробной смертности, а так же в уменьшении числа особей мужского пола по сравнению с контрольной группой.

В то же время, у крысят от матерей с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза имеет место задержка физического развития, что проявляется в более длительном сохранении признаков имматурности, замедлении по сравнению с контрольной группой процессов накопления массы тела после рождения.

Таким образом, результаты данной серии исследований констатируют негативное влияние поражения гепатобилиарной системы самок крыс различной этиологии на жизнеспособность и дальнейшее развитие их потомства, что согласно данным литературы (James O.M., 1991), нарушает формирование «старта здоровья» и существенно меняет способность организма к адаптации, его реактивность и резистентность.

Результаты второй серии исследования по установлению влияния патологии гепатобилиарной системы самок крыс на становление генеративного компартмента яичек их потомства позволили констатировать выраженное нарушение процесса становления сперматогенеза, нашедшее отражение, в первую очередь, в изменении весового индекса исследуемого органа и величины извитых семенных канальцев в яичке. О нарушении сперматогенеза судили так же по уменьшению суммарного количества сперматогенных клеток и их отдельных генераций в извитых семенных канальцах, снижению индекса сперматогенеза, увеличению количества канальцев со слущенным эпителием и гигантских сперматогенных клеток.

Одним из наиболее важных критериев продуктивности сперматогенеза является показатель полноценности зрелых мужских половых клеток. В ходе анализа морфофункциональных параметров эпидидимальных сперматозоидов было констатировано преимущественное снижение общего количества сперматозоидов в гомогенате придатков яичек животных опытных групп, увеличение количества мертвых сперматозоидов, а так же дегенеративных (патологических) форм мужских половых клеток. Исследование подвижности сперматозоидов позволило выявить у животных опытных групп снижение количества быстрых прогрессивноподвижных и слабоподвижных клеток, составляющих основную фертильную фракцию, происходящее на фоне увеличения количества неподвижных сперматозоидов. При этом, индекс подвижности сперматозоидов оказался сниженным по сравнению с контролем. Оценка показателей кислотной и осмотической резистентности мужских половых клеток выявила снижение исследуемых показателей у сперматозоидов животных подопытных групп.

Интегральным критерием эффективности процесса сперматогенеза и его чувствительности к действию неблагоприятных факторов среды является показатель фертильности биологического вида. О фертильности подопытных животных судили на основании исследования животных во втором поколении. Установлено, что у животных от матерей с экстрагенитальной патологией во втором поколении имеет место уменьшение количества пометов, увеличение доли мертворожденных животных в пометах, а так же изменение соотношения полов экспериментальных животных.

С целью раскрытия основных звеньев в патогенезе нарушения становления генеративной составляющей мужской половой железы была проведена серия опытов с использованием специфических мышинных моноклональных антител для верификации пролиферативной и апоптотической активности развивающихся половых клеток, а также с целью выявления и количественной обработки таких элементов микроокружения извитых семенных канальцев как макрофаги.

Установлено, что у животных опытных групп имеет место увеличение количества клеток, вступивших в митотическую активность, что, вероятно, отражает адаптивный характер пренатально действующего стресса. В то же время, количество клеток, экспрессирующих на своей поверхности антиген bcl-2⁺, являющийся регулятором апоптоза у таких животных уступает показателям в контроле, а количество клеток, с выявляемой (CPP32), - Caspase3, наоборот, значительно выше контрольных величин, что подтверждает ведущую роль апоптоза в патогенезе выявленных нарушении. При этом количество макрофагов в стромальном компоненте яичек оказалось существенно меньше, что свидетельствует о более глубоком характере угнетения морфофункциональных характеристик мужских половых желез у потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

О характере эндокринного компартмента яичек судили по показателям площади интерстициальной соединительной ткани, суммарного количества клеток Лейдига, соотношения различных морфофункциональных типов эндокриноцитов, размера их ядер, концентрации тестостерона и лютропина, а также по данным электронно-микроскопического исследования.

В ходе исследования было установлено, что у животных опытных групп имеет место увеличение площади межлочковой соединительной ткани в яичках, что косвенно может свидетельствовать в пользу развития в яичке воспалительного процесса и, в частности, о третьей (пролиферативной) стадии воспаления. Так же выявлено увеличение количества интерстициальных гландулоцитов, и их активных популяций на фоне снижения количества неактивных эндокриноцитов, что подтверждается показателем индекса активности клеток Лейдига, превышающим таковой в контроле. Функциональную транзиторную активацию интерстициальных гландулоцитов у животных подопытных групп подтверждают, так же, данные о размерах их ядер.

Выявленные изменения свидетельствуют о компенсаторной временной активации интерстициального компартмента мужских половых желез в ответ на действие перинатального стресса.

Для подтверждения данных об активации интерстициального компонента мужских половых желез в ответ на действие повреждающих факторов было проведено электронно-микроскопическое исследование клеток Лейдига. Обнаружено, что в клетках Лейдига яичек животных от матерей с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза увеличивается количество канальцев гладкого эндоплазматического ретикулума, митохондрий, секреторных включений, активизируется рибосомальный транспорт и увеличивается размер ядерных пор.

Функциональную составляющую эндокринной функции тестировали на основании концентрации тестостерона и лютеинизирующего гормонов в сыворотке крови лабораторных животных, являющихся морфологическим субстратом эндокринной функции (Бакалска М.В. и др., 2001). Установлено, что концентрация мужского полового гормона – тестостерона у животных подопытных групп превышает таковые значения в контроле. Аналогичная закономерность выявлена и при исследовании лютеинизирующего гормона гипофиза.

Результаты, полученные в ходе данной серии исследования подтверждают наличие активации эндокринного компартмента, приходящейся на период полового созревания (45-ый день наблюдения).

Исходя из всего вышеизложенного, внутриутробно развивающийся плод в условиях экстрагенитальной патологии матери в виде хронического поражения гепатобилиарной системы, находится в условиях постоянно, разносторонне действующих факторов перинатального стресса. По современным данным, стресс представляет собой выработанную в ходе эволюции приспособительную реакцию организма, включающую в себя все системы, в том числе эндокринную и иммунную, а так же все возможные уровни интеграции (Крыжановский Г.Н., 1985). Учитывая данное обстоятельство, у потомства самок крыс экспериментальным путем вызвали стрессовое воздействие, в качестве модели которого был использован иммобилизационный стресс. Установлено, что у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы различного генеза отмечается снижение стрессорезистентности как со стороны генеративного, так и эндокринного компартментов мужской половой железы, что является дополнительным риском развития мужского бесплодия.

В связи с чем, стресс-синдром из общего неспецифического звена адаптации к различным факторам среды превращается в общее неспецифическое звено патогенеза ряда заболеваний (Меерсон Ф.З. и др., 1985). Причем, выраженность и продолжительность компенсаторно-приспособительных реакций той или иной функциональной системы определяется, прежде всего, степенью ее зрелости и функциональной активности.

Таким образом, обобщая всё вышеизложенное, можно заключить, что у самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза рождается потомство с нарушенным «стартом здоровья», в том числе репродуктивного.

ВЫВОДЫ

1. Экстрагенитальная патология матери в виде хронического поражения гепатобилиарной системы различного генеза в условиях эксперимента приводит к нарушению морфофункционального становления мужских половых желез потомства.
2. Хроническое поражение печени самок крыс обуславливает неспецифические морфологические изменения со стороны генеративного компартмента мужской половой железы их потомства, что находит свое отражение в изменении весовых параметров органа, диаметра извитых семенных канальцев, количества

- половых клеток различных генераций, индекса сперматогенеза, а так же соотношения стромального и паренхиматозного компонентов.
3. Поражение гепатобилиарной системы самок крыс обуславливает нарушение становления поддерживающих клеток в сперматогенном пласте и, как следствие, усиление проницаемости гематотестикулярного барьера, что подтверждается повышением уровня антител к антигенам сперматозоидов и концентрации сывороточного ингибина В.
 4. Экспериментальное поражение гепатобилиарной системы самок крыс различного генеза приводит к нарушению фертильности их потомства, что подтверждается снижением концентрации сперматозоидов в эякуляте, подавлением их кислотной и осмотической резистентности, перераспределением фертильной и нефертильной фракций в сторону преобладания последней, а так же увеличением количества патологических форм мужских гамет.
 5. Хроническое поражение печени различного генеза у самок крыс обуславливает развитие неспецифических изменений в морфофункциональной организации интерстициального компартмента яичек их потомства, что находит свое отражение в изменении объема интерстициальной ткани, общего числа эндокриноцитов и их различных морфофункциональных типов, а так же концентрации вырабатываемых ими гормонов.
 6. Поражение гепатобилиарной системы самок крыс обуславливает развитие изменений со стороны микроокружения развивающихся мужских половых клеток, что находит отражение в снижении количества CD68⁺ клеток в интерстициальной соединительной ткани яичка подопытных животных.
 7. Одним из звеньев в патогенезе нарушения становления генеративного компартмента мужской половой железы является активация процесса апоптоза мужских половых клеток, о чем свидетельствует увеличение числа клеток с активной (CPP32) и уменьшение количества bcl-2⁺ клеток в сперматогенном пласте яичек экспериментальных животных.
 8. Патология гепатобилиарной системы самок крыс сопровождается развитием оксидативного стресса в тестикулярной ткани их потомства, что находит отражение в изменении индексов окисления в гептановой и изопропаноловой фазах в гомогенатах яичек подопытных животных.
 9. Экспериментальное моделирование хронической патологии гепатобилиарной системы у самок крыс сопровождается изменением цитокинового профиля сыворотки крови их потомства, что находит отражение в изменении уровня провосполительных цитокинов IL- β , IL- 2, IL-8 и TNF- α .
 10. Важную роль в патогенезе выявленных нарушений становления ключевых компартментов яичка играет аутоиммунный компонент, о чем свидетельствует увеличение концентрации антиспермальных антител в сыворотке крови у подопытных животных, более выраженное у крысят аутоиммунной группы.
 11. Экспериментальное моделирование иммобилизационного стресса у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы вызывает снижение стрессорезистентности со стороны структур генеративного

и эндокринного компартментов яичка, о чем свидетельствуют более грубые нарушения количественных и качественных характеристик как половых клеток различных степеней зрелости, так и эндокринных клеток у подопытных стрессированных крысят по сравнению с контролем.

12. Поражение гепатобилиарной системы различного генеза обуславливает развитие неспецифических изменений со стороны генеративного и эндокринного компартментов мужских половых желез их потомства, что подтверждается изменением количественных и качественных характеристик половых и эндокринных клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сизоненко, М.Л. Становление генеративной функции у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Актуальные вопросы акушерства и гинекологии в последипломном образовании врача: юбил. вып., посвящ. 25-летию кафедры акушерства и гинекологии УГМАДО. – Челябинск, 2007. – С. 68.
2. Сизоненко, М.Л. Влияние хронической экспериментальной патологии печени матери на эндокринную функцию мужских половых желез потомства / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Пробл. репродукции. – 2008. – Т.14, №2. – С. 45-47.
3. Сизоненко, М.Л. Становление генеративной функции семенников потомства самок крыс с хроническим поражением печени / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Пробл. репродукции. – 2009. – Т. 15, №1. – С. 16-19.
4. Сизоненко, М.Л. Морфофункциональная характеристика семенников потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени / М.Л. Сизоненко // Роль патологии печени матери в нарушении развития реактивности и резистентности потомства в условиях эксперимента: сб. науч. тр. / под ред. Г.В. Брюхина. – Челябинск : Челяб. гос. мед. акад., 2009. – Вып.2. – С. 63- 72.
5. Сизоненко, М.Л. Морфофункциональная характеристика эндокринного аппарата семенников потомства самок крыс с хронической героиновой интоксикацией / М.Л. Сизоненко. А.М. Быстров // Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию УГАВМ. –Троицк, 2009. – С. 83-84.
6. Сизоненко, М.Л. Характеристика инкреторной функции семенников потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различного генеза / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко, А.С.Романов // Вопросы морфологии XXI века: сб. науч. тр.: К 80-летию со дня рождения проф. А.А. Клишова / под ред. Р.К. Данилова, С.В. Костюкевича, И.А. Одинцовой. – Санкт- Петербург: ДЕАН, 2010. – Вып. 2. – С.70-75.
7. Сизоненко, М.Л. Особенности становления генеративной функции семенников потомства самок крыс с хроническим экспериментальным лекарственным поражением печени / М.Л. Сизоненко // Морфология. – 2011. – Т. 140, №5. – С. 54-55.

8. Сизоненко, М.Л. Особенности становления эндокринного компартмента мужских половых желез потомства самок крыс с хроническим лекарственным поражением гепатобилиарной системы / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Пробл. репродукции. – 2012. – Т. 18, №1. – С. 31-34.
9. Сизоненко, М.Л. Особенности морфофункционального становления яичек потомства самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин, Д.С. Ласьков // Морфология. – 2012. – №3. – С. 142.
10. Сизоненко, М.Л. Характеристика сперматогенного эпителия у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени алкогольного генеза / Д.С. Ласьков, М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Вестн. Уральской мед. академической науки. – 2012. – №2 (39). – С. 103-104.
11. Сизоненко, М.Л. Роль хронического экспериментального поражения печени матери в нарушении генеративной функции потомства / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко, А.С. Романов, И.В. Зубарев, Д.С. Ласьков // Вестн. Южно-Уральского гос. ун-та. – 2012. – №8 (267). – С. 98-102. – (Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура»).
12. Сизоненко, М.Л. Морфофункциональная характеристика сперматогенного пласта у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным лекарственным поражением печени / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Пробл. репродукции. – 2012. – Т.18, №4. – С. 12-15.
13. Сизоненко, М.Л. Роль экспериментального поражения печени матери в развитии физиологической незрелости потомства / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, №11. – С. 544-546.
14. Сизоненко, М.Л. Особенности сперматогенеза у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени алкогольного генеза / Д.С. Ласьков, Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды. – Челябинск, 2012. – С. 111.
15. Сизоненко, М.Л. Особенности морфофункционального становления генеративного и эндокринного компартментов яичек новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением печени лекарственного генеза / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Морфология. – 2013. – №5. – С. 113.
16. Сизоненко, М.Л. Влияние иммобилизационного стресса на двигательную активность сперматозоидов потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени / Г.В. Брюхин, Д.С. Ласьков, М.Л. Сизоненко // Пробл. репродукции. – 2013. – Т. 19, №1. – С. 12-15.
17. Сизоненко, М.Л. Влияние хронического аутоиммунного поражения печени самок крыс на состояние сперматогенного эпителия потомства в период новорожденности / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин, Е.В. Куставинова // Пробл. репродукции. – 2013. – Т. 19, №2. – С. 12-15.
18. Сизоненко, М.Л. Морфологическая характеристика сперматогенеза у потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией / М.Л.

- Сизоненко, Г.В. Брюхин, Д.С. Ласьков // Морфология. – 2013. – Т. 143, №1. – С. 59-62.
19. Сизоненко, М.Л. Сравнительная характеристика сперматогенного эпителия новорожденного потомства самок крыс с хроническим лекарственным поражением печени, ассоциированным введением парацетамола и тетрациклина / М.Л. Сизоненко, Е.А. Алымов, Е.В. Куставинова // Вестн. Челябинского гос. ун-та. – 2013. – №7. – С. 124.
 20. Сизоненко, М.Л. Влияние иммобилизационного стресса на кислотную резистентность эпидидимальных сперматозоидов у потомства самок крыс с поражением печени мезенхимального генеза / Д.С. Ласьков, Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Наука, образование, общество: тенденции и перспективы». – Москва, 2013. – Ч. IV. – С. 84.
 21. Сизоненко, М.Л. Физиологические параметры эпидидимальных сперматозоидов у потомства самок крыс с поражением печени различного генеза / Д.С. Ласьков, Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко // Збірник наукових праць міжнародної конференції «Реформування та розвиток науки: сучасні виклики». – 2013. – №2. – Ч. IV. – С. 23.
 22. Сизоненко, М.Л. Характеристика сперматогенного эпителия семенников у новорожденных крысят – потомства самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин // Морфология. – 2014. – №2. – С. 42-45.
 23. Сизоненко, М.Л. Характеристика двигательной активности сперматозоидов половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – №7. – С. 31-34.
 24. Сизоненко, М.Л. Особенности морфофункциональных характеристик сперматозоидов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени алкогольного генеза / Д.С. Ласьков, Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко, Е.А. Алымов // Пробл. репродукции. – 2014. – Т.20, №2. – С. 18-22.
 25. Сизоненко, М.Л. Особенности свободнорадикального окисления липидов в семенниках у потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко // Пробл. репродукции. – 2014. – Т.20, №3. – С. 7-9.
 26. Сизоненко, М.Л. Характеристика клеток Лейдига у потомства самок крыс с хроническим поражением печени различного генеза при действии иммобилизационного стресса / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко, Е.В. Куставинова // Пробл. репродукции. – 2014. – Т.20, №5. – С. 22-25.

«На правах рукописи»

Сизоненко Максим Леонидович

**РОЛЬ ХРОНИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ
ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ МАТЕРИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА В
НАРУШЕНИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАНОВЛЕНИЯ
МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук