

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
Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск*

Изучено влияние экспериментального поражения печени различного генеза у самок крыс на морфофункциональное становление генеративной функции потомства. Установлено, что патология печени матери в условиях эксперимента обуславливает нарушение фолликулогенеза в яичниках и сперматогенеза в семенниках потомства.

Ключевые слова: патология печени, потомство, сперматогенез, фолликулогенез.

Введение. Актуальность настоящего исследования определяется важной ролью материнского здоровья в решении проблемы воспроизводства полноценного потомства, в связи с чем вопросы сохранения здоровья женщины находятся в центре внимания ученых всего мира и рассматриваются в аспекте воспроизводства нового поколения. Современные медикобиологические и социально-демографические исследования свидетельствуют, что здоровье взрослого населения, в том числе женщин фертильного возраста, не является оптимальным, а риск мутагенных и патогенных воздействий на материнский организм в связи с экологическим неблагополучием в регионах с интенсивным развитием промышленности, не имеет тенденции к снижению [7]. В связи с этим беременности высокого риска, являющиеся основным источником спонтанных аборт, мертворождаемости, рождения маловесных, дефектных и физиологически незрелых детей, в настоящее время продолжают оставаться главным объектом изучения как для клиницистов, так и для теоретиков.

Одной из важнейших причин перинатальной патологии являются экстрагенитальные заболевания женщин, в структуре которых особое место, в силу своей распространенности, занимают болезни гепатобилиарной системы [9].

Ранее нами было показано, что у самок крыс с хроническим экспериментальным поражением гепатобилиарной системы имеет место задержка наступления беременности, пролонгирование беременности до 28–29 дней. При этом наблюдалось снижение численности пометов, характеризующихся выраженными признаками физиологической незрелости [2], что проявляется нарушением морфофункционального становления систем жизнеобеспечения, в том числе иммунной, кровяной, пищеварительной, нейроэндокринной [1].

Эти теоретические предпосылки явились причиной изучения особенностей становления генеративной функции у 60-дневного потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на белых лабораторных крысах «Вистар» (30 взрослых половозрелых самок) и их 60-дневном потомстве (60 крысят из 31 помета). Для достижения поставленной цели у взрослых половозрелых крыс-самок моделировалось хроническое поражение печени токсической и аутоиммунной этиологии.

Хроническое токсическое поражение («токсическая» – «Т»-группа) печени вызывалось путем однократного внутрибрюшинного введения взрослым половозрелым крысам Д (+)-галактозамина гидрохлорида («Sigma – G500», США) на 0,9 %-ном растворе натрия хлорида в дозе 250 мг/кг массы тела животного [3]. Экспериментальную «галактозаминовую» группу («Г»-группу) составили 20 крысят из 10 пометов.

Вторую группу составили животные, у которых создавался аутоиммунный процесс с преимущественным поражением печени («аутоиммунная» – «А»-группа) путем введения им 0,2 мл супернатанта шестидневной культуры *E.coli* (штамм ATCC 25922) [6]. Эту экспериментальную группу («Е»-группу) составили 17 крысят из 9 пометов.

О развитии патологического процесса в печени экспериментальных животных судили на основании морфологических изменений (очаговые бионекротические изменения гепатоцитов, дисконфлексация гепатоцитов, периваскулярная лимфогистиоцитарная инфильтрация, гипертрофия и гиперплазия купферовских клеток), биохимических критериев (повышение концентрации билирубина, аланин- и аспаргатаминотрансфераз и др.) и высокого титра печеночных аутоантител (1:640 и 1:1280).

Контрольную группу («К»-группа) составили интактные животные (23 крысенок из 12 пометов).

Объектом исследования явилось непосредственно потомство самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы на 60-й день после рождения, у которого проводилась оценка генеративной функции. Прежде всего осуществлялось определение весового индекса муж-

ских и женских половых желез. Оценка генеративной функции семенников проводилась на серийных гистологических срезах, окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну по общепринятой методике [8] с определением площади семенных извитых канальцев, суммарного количества сперматогенных клеток и их субпопуляционного состава, а также количества канальцев со слущенным эпителием и числа гигантских сперматогенных клеток.

Одним из показателей, отражающих фертильность сперматозоидов, является характер их подвижности. В связи с этим нами проводилась оценка подвижности эпидидимальных сперматозоидов по общепринятой методике с определением числа неподвижных (0 баллов), «дергающихся» на месте (1 балл), слабоподвижных (2 балла) и прогрессивно-подвижных (3 балла) сперматозоидов. Для постановки этого теста зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника [5]. Затем с использованием камеры Горяева в полученной взвеси подсчитывали сперматозоиды в 5 больших квадратах в течение трех часов через каждые 15 минут.

Для оценки фолликулогенеза в яичниках потомства экспериментальных животных на серийных гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, а также железным гематоксилином, проводился морфометрический анализ, позволяющий произвести дифференцированный подсчет овариальных фолликулов разных пулов. При этом использовалась общепринятая классификация Lintern Mooge (1967), по методике Pedesen a Peters [10], основанная на оценке фолликула с определенным количеством фолликулярных клеток и его диаметра. Во избежание ошибок и повторов при подсчете учитывались овариальные фолликулы на максимальных сечениях ооцитов, маркерами которых служили ядрышки. Фолликулы, имеющие в окружении менее 10 клеток, относили к стадии 1–2 (покоящиеся); 1–20 клеток – к стадии 3а; 21–60 клеток – к стадии 3б; 61–100 клеток – к стадии 4; от 101 до 200 клеток – к стадии 5а; 201–400 клеток – к стадии 5б (растущие); 401–

600 клеток – к стадии 6; больше 600 – к стадии 7–8 (полостные). Для активности атрезии подсчитывали общее количество атретических фолликулов.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6,0». Достоверность результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение.

Площадь поперечного сечения и диаметр семенных извитых канальцев оказались сниженными по сравнению с таковым в контроле. Так, если у интактных 60-дневных крысят диаметр семенных канальцев составил $234,47 \pm 5,527$, то у подопытных животных токсической и аутоиммунной групп исследуемый показатель составил всего $189,13 \pm 5,196$ и $198,78 \pm 4,69$ соответственно. Аналогичная закономерность выявлена и при изучении площади поперечного сечения канальцев. Так, у интактных крысят данный показатель составил 43574 ± 1592 мкм², а у подопытных крысят всего 28387 ± 1005 мкм² и 31298 ± 584 мкм² соответственно.

Важнейшим показателем структурно-функционального состояния семенника является характеристика сперматогенного пласта. Сперматогенный пласт изучался нами с учетом суммарного содержания сперматогенных клеток и их субпопуляционного состава. Обнаружено, что у интактных крысят суммарное содержание сперматогенных клеток составляет $265,9 \pm 33,53$, а у подопытных животных как токсической ($235,21 \pm 3,29$), так и аутоиммунной ($242,15 \pm 2,63$) групп снижено.

Наибольший интерес представляют данные дифференцированного анализа сперматогенных клеток с учетом их зрелости [8].

Нами установлено, что у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени имеет место изменение субпопуляционного состава сперматогенных клеток по сравнению с контролем (табл. 1).

Как видно из табл. 1, какой-либо закономерности в изменении числа сперматогоний различной степени зрелости (А, П, Б) у эксперименталь-

Таблица 1
Субпопуляционный состав сперматогенных клеток семенных извитых канальцев семенников экспериментальных животных (М ± m)

Сперматогенные клетки	Группа		
	Контрольная (К)	Опытная 1 (О1)	Опытная 2 (О2)
Суммарное содержание сперматогоний	44,94 ± 0,86	13,36 ± 0,66*	46,12 ± 3,00
Сперматогонии А	22,38 ± 0,18	20,65 ± 0,31*	20,72 ± 0,11*
Сперматогонии П	8,87 ± 0,18	9,08 ± 0,4*	9,75 ± 0,22*
Сперматогонии Б	13,69 ± 0,3	13,63 ± 0,33*	12,28 ± 0,49*
Сперматоциты I и II	194,57 ± 1,87	179,3 ± 2,5*	179,79 ± 1,56*
Сперматиды	16,46 ± 1,19	8,61 ± 0,5*	10,59 ± 0,79*
Сперматозоиды	9,94 ± 0,86	3,93 ± 0,49*	6,53 ± 0,92*
Суммарное кол-во сперматогенных клеток	265,9 ± 3,52	235,21 ± 3,2*	242,15 ± 2,6*

* Результаты статистически достоверны по сравнению с контролем (p < 0,05).

Проблемы здравоохранения

ных животных выявить не удастся. В то же время содержание сперматоцитов 1 и 2 порядка, сперматид и сперматозоидов в семенных извитых канальцах подопытных крысят снижено по сравнению с интактными животными. Вместе с тем у подопытных крысят выявлено существенное увеличение по сравнению с контрольной группой числа семенных извитых канальцев со слущенным эпителием, являющегося чувствительным индикатором интенсивности апоптотических процессов. Так, если у интактных крысят содержание канальцев со слущенным эпителием составляет $7,11 \pm 1,3$, то у подопытных животных обеих групп исследуемый показатель оказался существенно увеличенным и составил $25,5 \pm 3,1$ и $27,44 \pm 4,0$. Заслуживают внимания также данные, свидетельствующие об увеличении в семенных извитых канальцах подопытных крысят числа гигантских сперматогенных клеток. Так у интактных крысят содержание таких клеток в канальцах составило $0,32 \pm 0,02$, а у подопытных животных обеих экспериментальных групп этот показатель оказался равным $0,64 \pm 0,13$ и $0,55 \pm 0,08$.

Таким образом, анализ результатов данной серии исследования позволяет констатировать, что у потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы имеет место нарушение процесса сперматогенеза, о чем свидетельствует, прежде всего, снижение суммарного содержания сперматогенных клеток, а также количества сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов в семенных извитых канальцах.

Анализ двигательной активности сперматозоидов позволил выявить следующую закономерность. У подопытных половозрелых крысят общее содержание в 1 мл эпидидимальных сперматозоидов снижено по сравнению с контролем $(154,47 \pm 2,74) \cdot 10^6$ и составляет соответственно $(69,24 \pm 1,365) \cdot 10^6$ и $(99,29 \pm 1,716) \cdot 10^6$. Кроме того, у интактных крысят первоначально содержание прогрессивно-подвижных сперматозоидов составило $18,90 \pm 0,691 \%$, в то время как у крысят опытной группы 1 этот показатель был равен всего $8,25 \pm 1,876 \%$, а у животных второй опытной группы $1,86 \pm 1,742 \%$. Через 15 минут после начала исследования у подопытных крысят отсутствовали прогрессивно-подвижные сперматозоиды, в то же время у интактных животных число половых клеток данной популяции составило $0,25 \pm 0,125 \%$. Аналогичная закономерность выявлена и при анализе содержания слабоподвижных сперматозоидов (рис. 1).

Таким образом, на всех сроках исследования у подопытных крысят обеих групп число фертильных сперматозоидов (прогрессивно-подвижных и слабоподвижных) снижено по сравнению с контролем.

При этом у подопытных крысят обеих групп содержание нефертильных («дергающихся» на месте и неподвижных) сперматозоидов на большинстве сроков исследования оказалось повышенным по сравнению с группой сравнения (рис. 2).

В следующей серии нашего исследования проведен анализ особенностей фолликулогенеза в яичниках потомства самок крыс с эксперимен-

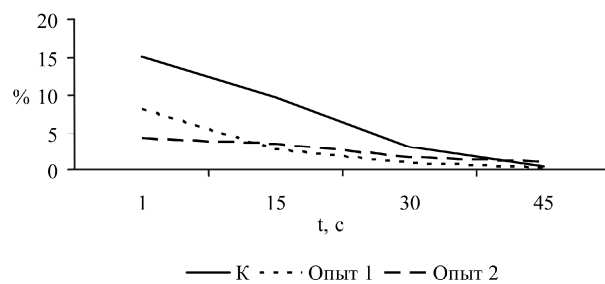


Рис. 1. Динамика изменения содержания эпидидимальных слабоподвижных сперматозоидов

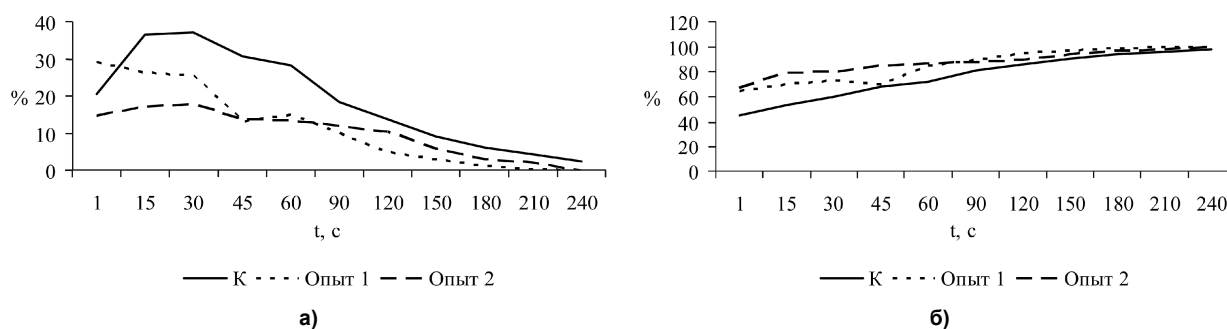


Рис. 2. Динамика изменения содержания эпидидимальных «дергающихся» (а) и неподвижных (б) сперматозоидов

Таблица 2

Популяционный состав фолликулов по степени зрелости
в яичниках экспериментальных животных (M ± m)

Показатель	Группа		
	К	O1	O2
Суммар. кол-во фоллик.	702 ± 53	526 ± 34	627 ± 58*
Фолликулы 1 типа	164 ± 28	80 ± 4	138 ± 22*
Фолликулы 2 - 3 а типа	90 ± 11	47 ± 6*	58 ± 6*
Фолликулы 3 б типа	64 ± 5	40 ± 4	76 ± 7*
Фолликулы 4 типа	62 ± 6	74 ± 6*	85 ± 5
Фолликулы 5 а типа	96 ± 9	54 ± 3*	52 ± 6*
Фолликулы 5 б типа	112 ± 16	107 ± 8	98 ± 6
Фолликулы 6 типа	42 ± 3	40 ± 5*	54 ± 6
Фолликулы 7– 8 типа	96 ± 9	84 ± 7*	66 ± 5
Малые фолликулы	254 ± 25	127 ± 27	196 ± 46*
Средние фолликулы	222 ± 16	168 ± 15	213 ± 14*
Большие фолликулы	226 ± 19	231 ± 24	218 ± 19

* Результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

тальным поражением печени (табл. 2). Одним из важнейших показателей, отражающих функциональное состояние яичников, является суммарное содержание фолликулов различной степени зрелости [4]. Нами установлено, что у подопытных животных суммарное содержание фолликулов снижено по сравнению с контролем.

Так, у интактных крысят этот показатель составил 702 ± 53 , в то время как у подопытных животных и токсической (526 ± 34), так и аутоиммунной (627 ± 58) групп суммарное содержание фолликулов различной степени зрелости оказалось сниженным. При этом дифференцированный подсчет овариальных фолликулов позволил выявить определенную закономерность: у подопытных крысят содержание больших фолликулов практически не отличается от контроля, в то время как число малых фолликулов, являющихся резервом будущих половых клеток, существенно снижено (см. табл. 2). Уменьшение числа растущих фолликулов в яичниках подопытных крысят обеих групп в период становления половой зрелости согласуется с результатами, полученными при анализе числа атретических фолликулов в их яичниках. У потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза число атретических фолликулов существенно увеличено по сравнению с контролем. Так, у подопытных животных токсической и аутоиммунной групп число атретических фолликулов соответственно составило 39,54 и 31,67 %, в то время как у животных контрольной группы исследуемый показатель оказался равным 30,7 %.

Таким образом, результаты данной серии исследования позволяют констатировать, что у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени, в яичниках имеет место нарушение процесса фолликулогенеза, что, прежде всего, находит свое проявление в уменьшении числа рас-

тущих фолликулов и как следствие уменьшение суммарного количества фолликулов, а также в усилении процессов атрезии фолликулов.

Заключение. Нарушение условий внутриутробного развития при моделировании поражения гепатобилиарной системы матери приводит к нарушению процессов формирования коррелятивных взаимоотношений в гипофизарно-тиреоидно-адреналово-половой системе плода, что обуславливает задержку структурного становления репродуктивной системы. Развивающийся комплекс изменений репродуктивной системы потомства может возникнуть в результате массивного проникновения через фетоплацентарный барьер патологических продуктов метаболизма при токсической патологии печени, а также сенсibilизированных цитотоксических Т-лимфоцитов, специфических антител, циркулирующих иммунных комплексов и других гуморальных факторов иммунной системы, что наиболее характерно для аутоиммунного поражения печени. Под влиянием этих факторов происходит нарушение процессов мейоза, усиление дегенеративной гибели половых клеток и уменьшение их суммарного количества. В целом, выявленные нарушения процессов сперматогенеза и фолликулогенеза позволяют говорить, что у самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы рождается потомство с нарушением становления репродуктивной функции.

Литература

1. Брюхин, Г.В. Влияние хронических заболеваний печени матери на развитие потомства в условиях эксперимента / Г.В. Брюхин // Роль патологии печени матери в нарушении развития, реактивности и резистентности потомства в условиях эксперимента: сб. – Челябинск, 2009. – С. 6–16.

2. Брюхин, Г.В. Влияние хронических холестатических поражений печени матери на по-

Проблемы здравоохранения

томство в условиях эксперимента / Г.В. Брюхин // *Морфология*. – 1994. – № 2. – С. 18–21.

3. Венгеровский, А.И. Механизм действия гепатопротекторов при токсическом поражении печени / А.И. Венгеровский, А.С. Саратиков // *Фармакология и токсикология*. – 1988. – № 1. – С. 89–93.

4. Волкова, О.В. Морфогенетические основы развития и функции яичников / О.В. Волкова, Т.Г. Боровая. – М., 1999. – 254 с.

5. Егорова, Г.М. Токсикология новых промышленных химических веществ / Г.М. Егорова, Н.Г. Иванов, И.В. Саноцкий. – Л., 1966. – С. 33–36.

6. Моделирование воспалительного процесса в печени / Б.А. Сааков, А.И. Поляк, В.Е. Рычнев и др. // *Моделирование, методы изучения и эксперимен-*

тальная терапия патологических процессов. – М., 1967. – С. 119–123.

7. Николаева, Л.Б. Первая беременность и первые роды: моногр. / Л.Б. Николаева, Г.А. Ушакова. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – 264 с.

8. Ухов, Ю.И. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников / Ю.И. Ухов, А.Ф. Астраханцев // *Арх. анат., гистол. и эмбриол.* – 1983. – № 3. – С. 66–72.

9. Шехтман, М.М. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных / М.М. Шехтман. – М.: Триада-Х, 2003. – 816 с.

10. Pedersen, T. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary / T. Pedersen, H. Peters // *J.Reprod. Fertil.* – 1968. – Vol. 17. – P. 555–557.

Поступила в редакцию 10 декабря 2011 г.