

Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей

Сообщение 2: Исследование последствий острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей

Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.б.н. Семенов Хызыр Хысаевич, schmt@yandex.ru

Работа посвящена исследованию последствий влияния острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки лабораторных крыс и мышей. В эксперименте были использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии НУ/У, выведенные и поддерживаемые в НЦБМТ ФМБА России, и мыши линии C57BL/6Y, поддерживаемые также в нашем Центре. Виргинных самок крыс и мышей на 9-16 дни постгипоксического периода спаривали с интактными самцами, чтобы выявить последствия влияния общей гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки. Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили, вскрывая самок на 19-20 дни беременности. Установлено, что при общей смертности эмбрионов в постимплантационном периоде развития в 39,1% у самок крыс и в 38,7% у самок мышей доля смертности эмбрионов, обусловленная влиянием острой гипоксии, составила 32,89% и 31,76% соответственно. Потери из числа овулировавших яйцеклеток на доимплантационной стадии у самок в опыте составили у крыс 14,3%, у мышей – 26,7%. Таким образом, суммарные потери под влиянием острой гипоксии на репродуктивные клетки самок крыс были равны 47,16%, у самок мышей – 58,45%. Следует также отметить, что 6 самок крыс и 4 самки мышей в опыте «прохолостились», т.е. при вскрытии у них не обнаружено ни одного имплантанта вообще, в то время как у контрольных животных обоих видов не выявлено ни одного случая их отсутствия. Объясняется это, видимо, воздействием гипоксии на самку в период ее особо чувствительной стадии овогенеза, что, вероятно, находит подтверждение в широком размахе величины этого показателя изменчивости от 0 до 100% у самок опытных групп (рис. А-Е).

Ключевые слова: острая гипобарическая гипоксия, женские репродуктивные клетки, эмбриональная смертность.

Период дифференциации мужских и женских генеративных клеток протекает постоянно. Знание длительности отдельных стадий сперматогенеза и овогенеза позволяет оценить чувствительность клеток на каждой стадии. При этом используется метод доминантных леталей (ДЛ), что обозначает наследственные изменения в половых клетках

родительских особей, которые вызывают смерть потомков первого поколения во время эмбрионального развития. ДЛ приводят к увеличению эмбриональной смертности и, соответственно, снижению выживаемости эмбрионов и плодовитости самок. ДЛ могут быть индуцированы как в мужских, так и в женских репродуктивных клетках, и в каждый

конкретный момент при обработке животного мутаген воздействует на клетки, находящиеся на разных стадиях сперматогенеза. После однократного мутагенного воздействия самца спаривают с интактными самками и затем исследуют эмбриональную смертность. Изменение эмбриональной смертности будет отражать чувствительность клеток на каждой стадии сперматогенеза [1]. Таким образом, было экспериментально установлено, что наиболее чувствительны репродуктивные клетки у мышей на второй неделе (поздние сперматиды) сперматогенеза. Ранее, исследуя частоты ДЛ, индуцированных тиофосфамидом в половых клетках самцов крыс, нами было установлено, что наибольшей чувствительностью обладают поздние и средние сперматиды (вторая и третья недели) [3]. Исходя из изложенного и учитывая, что процессы сперматогенеза и овогенеза у мелких грызунов (мышей и крыс) протекают одинаково, и по причине отсутствия аналогичных исследований у самок крыс и мышей мы ставили **целью** своей работы изучить влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки у самок крыс и мышей на второй и начале третьей недели постгипоксического периода.

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на крысах низкоустойчивой к гипоксии линии (НУ/У), выведенных и поддерживаемых в НЦБМТ ФМБА России, а также на мышях линии C57BL/6Y, поддерживаемых в нашем Центре. В опыте и в контроле были использованы половозрелые животные обоих видов, которые содержались в конвенциональных условиях, в пластмассовых клетках Т2 с автопоилка-

ми и получали гранулированный комбикорм фирмы «Лабораторкорм» *ad libitum*. Дополнительно к нему еженедельно им выдавали белково-витаминную подкормку (состав: овсянка, сухое молоко, витамины А, Д, Е в масле). Для исследования последствий влияния острой гипобарической гипоксии виргинных самок крыс и мышей подвергали воздействию гипоксии. На 9-16 дни постгипоксического периода самок подсаживали к интактным самцам на ночь (в соотношении 1:1 у крыс и 2:1 у мышей), чтобы зафиксировать точный срок беременности. Утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс и влагалищных пробок у самок мышей отбирали и вели отсчет срока беременности. Для учета эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок крыс вскрывали на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены 6 самок крыс и 4 самки мышей из-за полного отсутствия имплантантов. Таким образом, было исследовано по 60 самок крыс и мышей в опыте и по 50 в контроле.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством

по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [4]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии Центра. Исследования направлены на изучение последствий влияния острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей.

Моделирование острой гипобарической гипоксии для самок крыс осуществляли в барокамере при разрежении атмосферы в 145 мм рт. ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. Подъем на «высоту» длился 1 мин. У низкоустойчивых животных время жизни на «высоте» не превышает 60 сек., что, естественно, не может являться значимой мерой воздействия, способной оказать существенное влияние на репродуктивные клетки. Поэтому после подъема самки на критическую «высоту» и с момента, когда она начинала биться в

агонии, во избежание ее гибели, «опускали» до предельной для нее «высоты» — 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин.

Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на самок мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

В настоящем эксперименте виргинных самок крыс и мышей подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии и на 9-16 дни постгипоксического периода спаривали с интактными самцами, чтобы изучить последствия влияния гипоксии на женские репродуктивные клетки. Для учета эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок вскрывали на 19-20 дни беременности. Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в таблице.

Таблица

Последствия влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самок крыс и мышей

Показатель	Крысы		Мыши	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Число самок	60	50	60	50
Число мест имплантации	497	483	341	387
Среднее число эмбрионов на 1 самку ($M \pm m$)	$8,42 \pm 0,39$	$9,66 \pm 0,27$	$6,32 \pm 0,27$	$7,74 \pm 0,18$
Коэффициент вариации	35,7	19,82	31,05	16,30
Число живых эмбрионов (всего)	303	453	209	360
Среднее число живых эмбрионов ($M \pm m$)	$5,12 \pm 0,35$	$9,06 \pm 0,27$	$3,87 \pm 0,35$	$7,20 \pm 0,18$
Коэффициент вариации	51,4	20,76	65,79	17,57
Мертвых эмбрионов,				
всего (число)	194	30	132	27
% к общему числу	39,1	6,21	38,71	6,98
в том числе погибло от гипоксии				
число	163	-	108	-
% от общего числа имплантов	32,89	-	31,67	-

Согласно полученным экспериментальным данным, среднее число всех имплантатов на 1 самку крыс составило в опыте $8,42 \pm 0,39$, в контроле – $9,66 \pm 0,27$; у мышей – соответственно, $6,32 \pm 0,27$ и $7,74 \pm 0,18$. Из этого следует, что потери до имплантации у крыс равнялись 14,3%, у мышей – 26,7%. Для сравнения приведем аналогичные данные, полученные в нашем предыдущем сообщении [2], где самки обоих видов до спаривания с самцами не подвергались воздействию гипоксии, т.е. в опыте и контроле находились в идентичных условиях. Как показали результаты анализа, среднее число живых и мертвых эмбрионов на самку у крыс опыте и контроле составило $8,57 \pm 0,021$ и $8,60 \pm 0,17$; у самок мышей – соответственно, $7,45 \pm 0,19$ и $7,44 \pm 0,20$.

Равные показатели по числу имплантатов на самку в опыте и контроле у обоих видов животных свидетельствуют об отсутствии у них доимплантационных потерь. Значительные потери до имплантации в настоящем эксперименте, видимо, были вызваны либо овуляцией аномальных яйцеклеток, не способных к оплодотворению, либо уже будучи оплодотворенными, в силу каких-то причин прекратившими дальнейшее развитие. В любом варианте, без сомнения, они обусловлены влиянием острой гипоксии. Кроме того, согласно полученным в эксперименте данным, смертность эмбрионов в постимплантационном периоде развития у самок крыс опытной группы, в целом, составила 39,1%, у самок контрольной группы (спонтанная эмбриональная смертность) – 6,21%. Аналогичные показатели у мышей равнялись 38,79% и 6,98% соответственно. Следовательно, правомерно полагать, что разница по уровню эмбриональной смертности на

постимплантационной стадии развития у самок опытных и контрольных групп обоих видов была обусловлена влиянием гипоксии. У крыс опытной группы она составила 32,89%; у мышей – 31,75%. Таким образом, суммарная эмбриональная смертность, вызванная воздействием острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки, у самок крыс была равна 47,16%; у самок мышей – 58,45%.

Вместе с тем, необходимо указать, что у 6 самок крыс и у 4 самок мышей в опытных группах при вскрытии не обнаружено имплантатов вообще (рис.). По этой причине они не могли быть включены в таблицу результатов вскрытия. У самок контрольных групп обоих видов не выявлено ни одного случая их отсутствия. Полученные данные позволяют утверждать, что эффект гипоксии определяется, главным образом, стадией овогенеза у самки в момент ее воздействия. Если самка подвергалась воздействию острой гипобарической гипоксии в наиболее чувствительную стадию овогенеза, то эффект ее влияния будет максимальным и наоборот (рис. А-Е). На иные причины, способные вызывать столь высокие колебания числа имплантатов у самок, едва ли можно сослаться у высокоинбредных животных, каковыми являются исследуемые виды.

Выводы

Проведенные исследования убедительно показали существенное влияние острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки у лабораторных крыс и мышей, вызывая высокую эмбриональную смертность на постимплантационной стадии развития. Уровень смертности эмбрио-

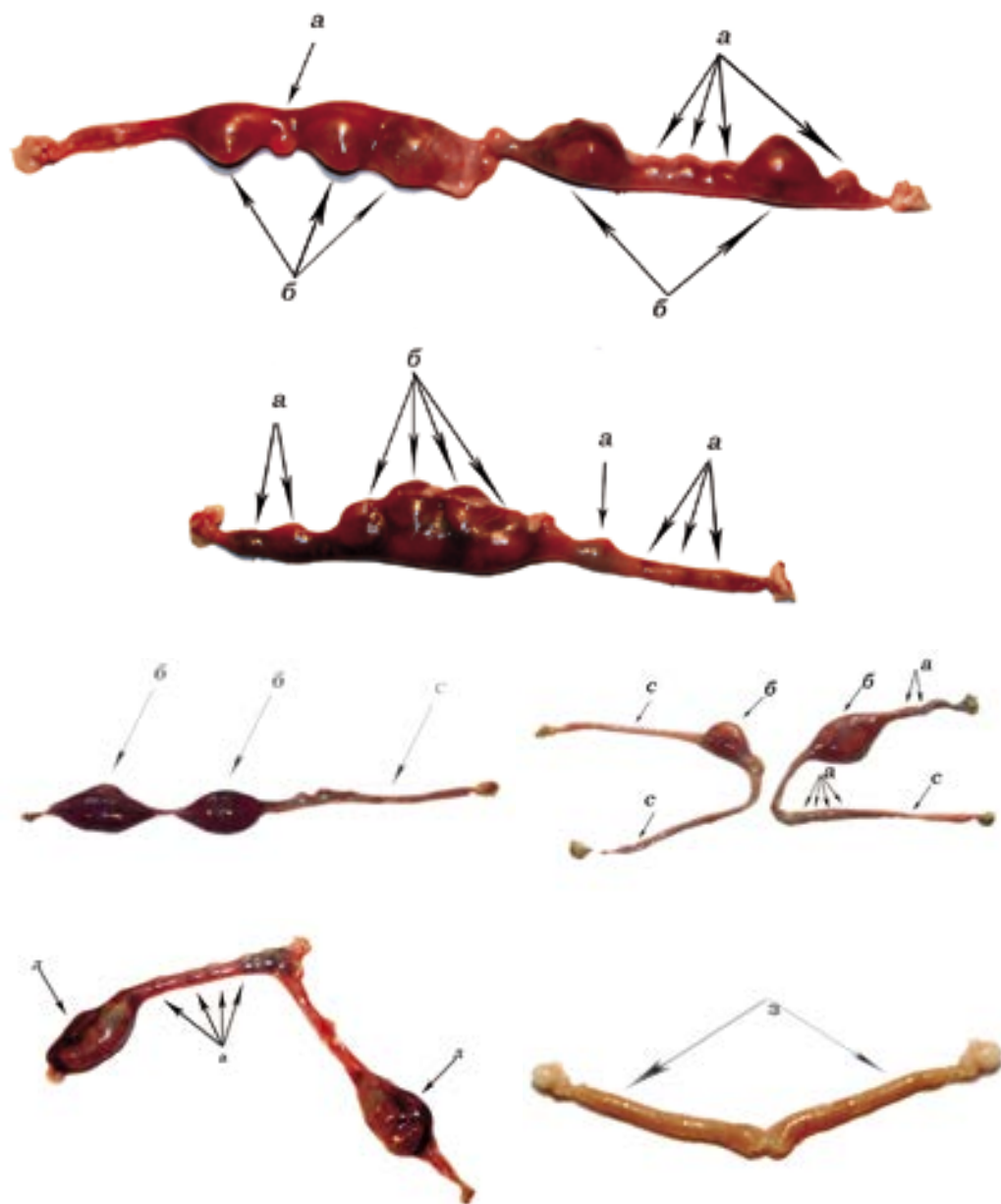


Рис. Матки самок крыс, подверженных острой гипобарической гипоксии, вскрытых на 20-й день беременности, на которых хорошо видно, что остановка эмбрионов в развитии происходит в наиболее уязвимые периоды эмбриогенеза:

- а – период имплантации – 4-6-й день развития, едва заметны децидуамы;
- б – период раннего органогенеза – 10-14-й день развития;
- в – отсутствие имплантантов – «остановка» в развитии на доимплантационной стадии;
- г – эмбрионы, пережившие гипоксию.

нов после имплантации под влиянием острой гипоксии у крыс составил 32,89%, у мышей – 31,75%. Доля потерь на доимплантационной стадии у самок опытных групп составила: у крыс – 14,3%, у мышей – 26,7%. Таким образом, суммарные потери, обусловленные влиянием острой гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки, составили: у крыс 47,18%, у мышей – 58,45%. При этом следует также указать на высокую изменчивость уровня эмбриональной смертности на постимплантационной стадии развития у животных опытных групп обоих видов.

Список литературы

1. **Малашенко А.М., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б.** Определение мутагенной активности химических соединений с использованием лабораторных мышей. Методические рекомендации. - М. 1985.
2. **Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеев Е.Л., Капанадзе Г.Д.** Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 1: Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза на жизнеспособность эмбрионов у самок крыс и мышей // Биомедицина. № 3. 2012. С. 73-78.
3. **Семенов Х.Х., Уолкер Д.** Индукция доминантных леталей в половых клетках самцов крыс тиофосфамидом // Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. - М. 1987. Часть I. 124 с.
4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.

Influence of acute hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice Message 2: research of consequences of acute hypobaric hypoxia on female gametes of rats and mice

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko

Work is devoted to research of consequences of influence of acute hypobaric hypoxia on female gametes of rats and mice. In experiment the rats of the strain HY/Y low-steady against a hypoxia removed and supported in SCBMT and a mouse strain C57BL/6Y, supported also in our Center were used. Virgin females of rats and mice for 9-16 days of the post-hypoxemic period coupled to intact males to reveal consequences of influence of the general hypobaric hypoxia on female gametes. The accounting of embryonic mortality in the uterine period of development carried out, opening females for 19-20 days of pregnancy. As a result of the conducted research the following is established. At the general mortality of embryos in the post-implantation period of development in 39,1% at females of rats and – 38,73% at females of mice, the share of mortality of the embryos, caused by influence of a sharp hypoxia, made at them 32,89% and 31,76%, respectively. Losses from among ovulated ova at a preimplantation stage at females in experience made at rats 14,3%, at mice – 26,7%. Thus, under the influence of acute hypoxia on females gametes of rats females of mice had total losses equal 47,16%, – 58,45%. It should be noted also that 6 females of rats and 4 females of mice in experience had no any implant in general. While at control animals of both types it isn't revealed any case of their absence. It is explained, apparently, by that it, was caused by impact of a hypoxia on a female in the period of her especially sensitive stage of an ovogenesis that probably finds confirmation in wide scope of a variation of size of this indicator at females of skilled groups.

Key words: acute hypobaric hypoxia, female gametes, embryonic mortality.