



Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки млекопитающих (лабораторных крыс и мышей)

Х.Х. Семёнов, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко

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

Контактная информация: к.б.н. Семенов Хызыр Хыйсаевич, drsmx@yandex.ru

Проведено исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самок и самцов крыс и мышей. В эксперименте использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии *HY/SmY* и мыши линии *C57BL/6Y*, выведенные и поддерживаемые в НЦБМТ ФМБА России. Половозрелых самцов и самок крыс и мышей подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии и на 9-18 день постгипоксического периода спаривали (по видам). Для выявления последствий острого гипоксического стресса на половые клетки крыс и мышей проводили учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития, самок вскрывали на 19-20 дни беременности. Установлено, что при общей смертности эмбрионов в постимплантационном периоде, равной 48,11% у самок крыс и 49,71% – у самок мышей, доля смертности, обусловленная влиянием острой гипоксии, составила 40,57% и 43,24% соответственно. Потери из числа овулировавших яйцеклеток на доимплантационной стадии развития у крыс равнялись 22%, у мышей – 8%. Таким образом, суммарные потери, вызванные воздействием острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки, составили у самок крыс 62,57%, у самок мышей – 51,24%.

Ключевые слова: острая гипоксия, репродуктивные клетки, лабораторные крысы и мыши.

Введение

Окружающая нас атмосфера – главный источник существования всего живого на земле. От того, каким воздухом мы дышим, зависит наше самочувствие, предрасположенность к различным заболеваниям и, в конце концов, продолжительность самой жизни. Как известно, атмосфера представляет собой смесь газов, основными из которых являются азот – 78,09% и кислород – 20,95%. Од-

нако в городах, особенно крупных, на их соотношение вносят свои коррективы выхлопные газы машин, работа котельных и т.п. И в результате заметно ощущается разница между «городским» и «загородным» воздухом. О влиянии городского воздуха на развивающийся человеческий плод свидетельствуют исследования, проведенные среди регистрируемых беременностей у европейского населения планеты [1]. При этом

установлено, что 15% эмбрионов погибают на самых ранних стадиях развития (спонтанные аборты), 3% составляют мертворожденные, 2% – неонатальная смертность. Естественно, нет сомнения в том, что здесь сказывается влияние отрицательных факторов экологии в целом. Но вместе с тем известно также, что из всех стрессирующих воздействий, которым может быть подвержен зародыш в период внутриутробного развития, гипоксия является наиболее распространенным и клинически значимым, приводящим к эмбриологическим последствиям и различным патологиям развития.

На основании изложенного, **целью** настоящей работы было установить, вносит ли реальный вклад в эмбриональную смертность кратковременное воздействие острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки млекопитающих (лабораторных крыс и мышей).

Материалы и методы

В эксперименте использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии и мыши линии *C57BL/6Y*. И те, и другие поддерживаются в нашем Центре (НЦБМТ ФМБА России). Для исследования последствий влияния острой гипобарической гипоксии на мужские и женские репродуктивные клетки половозрелые крысы и мыши были подвержены ее воздействию. Сразу после проведения гипоксии к самцам крыс и мышей подсаживали интактных самок (по видам), с которыми они находились в течение недели, что необходимо для «очистки» их от зрелых сперматозоидов, скопившихся в семяприемнике от предыдущих стадий сперматогене-

за. На 9-18 дни постгипоксического периода самок и самцов ссаживали 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 самки обоих видов, у которых полностью отсутствовали имплантаты. Таким образом, было исследовано 40 самок крыс и 50 самок мышей в опыте и, соответственно, 30 и 40 самок в контроле.

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 No. 123), Strasbourg, 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 [2]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследования направлены на изучение последствий влияния острой гипобарической гипок-

сии на мужские и женские репродуктивные клетки лабораторных крыс и мышей.

Воздействие острой гипобарической гипоксии на крыс осуществляли в барокамере, при разрежении атмосферы 145 мм рт. ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. «Подъем на высоту» длится 1 мин. У низкоустойчивых к гипоксии животных время жизни «на высоте» не превышает 60 сек, что, естественно, не может являться значимой мерой воздействия, способной оказать влияние на репродуктивные клетки. Поэтому после подъема крысы на критическую «высоту», и с момента, когда она начинает биться в агонию, во избежание гибели, ее «опускали» до предельной «высоты» 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин. Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в табл. и на рис. Эмбриологический анализ позволил установить, что число имплантатов на одну самку крыс в опыте составило в среднем 7,95, в контроле – 10,16; у мышей – 7,12 и 7,72 соответственно. Потери на доимплантационной стадии развития (Р), согласно расчету, произведенному по формуле:

$$P = \left(1 - \frac{\text{число имплантатов на 1 самку в опыте}}{\text{число имплантатов на 1 самку в контроле}}\right) \times 100$$

составили: у крыс – 22%, у мышей – 8%.

В определенной мере эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее [4] при цитологическом исследовании 3,5-дневных эмбрионов на доимплантационную смертность у мышей разных генотипов (101, В6 и СВА), подверженных влиянию мутагена (тио-ТЭФ). Если нормально развивающийся эмбрион на 4-е сутки достигает стадии бластоцисты (~64 бластомеров), то доминантные летали вызывают оста-

Таблица

Последствия влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки крыс и мышей

Показатель	Крысы		Мыши	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Число самок	40	30	50	40
Число мест имплантаций	318	305	356	309
Число эмбрионов на одну самку	7,95±0,35	10,16±0,21	7,12±0,17	7,72±0,19
Коэффициент вариации	29,60	22,30	23,71	21,70
Число живых эмбрионов	162	282	179	289
Среднее число эмбрионов на одну самку	4,05±0,23	9,40±0,18	3,56±0,21	7,22±0,2
Коэффициент вариации	47,15	21,75	49,10	17,45
Мертвых эмбрионов всего	153	23	177	20
% от общего числа	48,11	7,54	49,71	6,47
В т.ч. спонтанная эмбриональная смертность		7,54		6,47
В т.ч. % погибших от гипоксии	40,57		43,24	

новку дробления на стадиях 2-16 бластомеров. Доля эмбрионов, погибших до имплантации (остановившихся на стадиях 2-16 бластомеров), была максимальной у мышей высокочувствительного генотипа 101 (27,8%), несколько меньше – у В6 (21,0%) и минимальной – у СВА (12,5%). Различия между высоко- и низкоустойчивыми генотипами достоверны ($p=0,01$). Таким образом, повышенная смертность эмбрионов крыс на данной стадии развития обусловлена более высокой чувствительностью их генотипа к воздействию острой гипоксии. Вместе с тем смертность эмбрионов после имплантации считается точным критерием оценки частоты индуцированных доминантных леталей, независимо от средств индукции (химические мутагены, радиация, гипоксия и т.п.). В нашем эксперименте полученные данные по уровню постимплантационной эмбриональной смер-

ности позволили установить высоко достоверную разницу ($p=0,001$) между опытными и контрольными группами у обоих видов лабораторных животных. Так, смертность эмбрионов на постимплантационной стадии развития у самок крыс опытной группы в целом составила 48,11%, у самок контрольной группы (спонтанная эмбриональная смертность) – 7,54%. Аналогичные показатели у мышей были равны 49,71% и 6,47% соответственно. Исходя из этого, реальная смертность эмбрионов после имплантации, обусловленная влиянием острой гипоксии у крыс, составила 40,57%, у мышей – 43,24%. Таким образом, суммарные потери из числа овулировавшихся яйцеклеток под воздействием острой гипобарической гипоксии были равны 62,57% у крыс и 51,24% у мышей.

На представленном рисунке наглядно иллюстрируются последствия влияния, оказанного острой гипобарической



Рис. Последствия влияния острой гипобарической гипоксии на потомство крыс, репродуктивные клетки которых были подвержены её воздействию. Остановка эмбрионов в развитии происходит: а – на 5-6-й день; в – на 8-9-й день; с – на 12-14-й день; d – на 15-17-й день; e – эмбрионы, пережившие гипоксию.

гипоксией на потомство крыс, репродуктивные клетки которых были подвергнуты ее воздействию. Сравнение с ранее полученными [2, 6] нами аналогичными данными, зафиксированными также в результате воздействия острой гипоксии, но раздельно на женские и мужские половые клетки, показывает, что по внешним проявлениям на эмбрионах видимых различий не наблюдается. Единственное отличие между ними в том, что при одновременном воздействии на половые клетки самок и самцов количество эмбрионов, погибших на более ранних стадиях развития (5-6 день), несколько выше, чем при раздельном воздействии. И это вполне объяснимо, поскольку в настоящем эксперименте зародыши подверглись двойному воздействию гипоксии (через материнские и отцовские гаметы). К тому же известно: чем выше доза фактора индукции, тем раньше прекращается дробление. Тио-ТЭФ в дозе 1,25 мг/кг вызвал остановку на стадии 2-16 бластомеров 27% эмбрионов, в дозе 2,5 мг/кг – 48% и в дозе 5мг/кг – 100% [5].

Выводы

Результаты проведенного исследования по изучению последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки лабораторных крыс и мышей убедительно показали ее существенное влияние на жизнеспособность потомства. Так, уровень смертности после имплантации под воздействием острой гипоксии у крыс составил 40,57%, у мышей – 43,24%. Доля потерь на до-

имплантационной стадии у самок крыс составила 22%, у мышей – 8%. Следовательно, суммарные потери из числа овулировавших яйцеклеток, обусловленные влиянием острой гипоксии на женские и мужские репродуктивные клетки, составили у крыс 62,57%, у мышей – 51,24%. Эмбриологический анализ показал также, что существенная доля зародышей погибает или непосредственно при имплантации, или спустя 2-3 дня, и представлена децидами.

Список литературы

1. Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Хромосомные нарушения и перинатальная смертность // В кн.: «Медицинская генетика». - М.: Медицина. 1984. С. 123-124.
2. Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н. Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей // Биомедицина. 2015. № 1. С. 60-65.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. Малащенко А.М., Семенов Х.Х. Роль генотипа самок в проявлении доминантных летальных мутаций, индуцированных тиофосфамидом в сперматидях самцов мышей // Генетика. 1980. Т. XVI. № 11. 2003 с.
5. Малащенко А.М., Семенов Х.Х., Селезнева Г.П., Суркова Н.И. Исследование мутагенного эффекта химических соединений на лабораторных мышах // Генетика. 1978. Т. 14. № 1. 52 с.
6. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н. Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 2: Исследование последствий гипобарической гипоксии на женские репродуктивные клетки крыс и мышей // Биомедицина. 2014. № 2. С. 80-85.

Research of consequences of impact of a sharp hypobaric hypoxia on male and female reproductive cells of mammals (laboratory rats and mice)

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

A study of the effects of exposure to sharp hypobaric hypoxia on the reproductive cells of male and female rats and mice was held. In the experiment, low resistant to hypoxia *NY/SmY* lines of rats and mouse line *C57BL/6Y* had used, all of it was bred and maintained in SCBMT of FMBA of Russia. Sexually mature male and female rats and mice were exposed to acute hypobaric hypoxia on 9-18 day period posthypoxic mated (by type). To determine the effects of acute hypoxic stress in the germ cells of rats and mice to account embryonic mortality in the uterine period of development, the female opened by 19-20 days of pregnancy. It was found that the overall mortality in post-implantation embryos period, equal to 48.11% in female rats and 49.71% in female mice, the proportion of deaths due to the influence of acute hypoxia was 40.57% and 43.24%, respectively. Losses among the ovulated eggs in the pre-implantation stage of development in rats were 22%, in mice - 8%. Thus, the total loss caused by exposure to sharp hypobaric hypoxia exposure on male and female reproductive cells, accounted for 62.57% in female rats, in female mice - 51.24%.

Key words: sharp hypoxia, reproductive cells, laboratory rats and mice.