



Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей

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

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

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

Работа посвящена исследованию последствий влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самцов 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 С57BL/6У, поддерживаемые также в НЦБМТ. Молодых половозрелых самцов крыс и мышей, подвергнув воздействию острой гипобарической гипоксии, на 9-18 дни постгипоксического периода спаривали с виргинными самками. Для выявления последствий острого гипоксического стресса на мужские половые 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 32,3% у самок крыс и в 40,2% у самок мышей доля смертности эмбрионов, обусловленная влиянием острой гипоксии, составила 27,2% и 32,8% соответственно. Потери из числа овулировавшихся яйцеклеток на доимплантационной стадии у самок в опыте составили у крыс – 16,6%, у мышей – 5,2%. Таким образом, суммарные потери под влиянием острой гипоксии на мужские репродуктивные клетки были равны у самок крыс 43,8%, у самок мышей – 38,0%. Экспериментально установлено также, что уровень постимплантационной эмбриональной смертности находится в прямой зависимости от «качества очистки» (числа спариваний) самца от сперматозоидов предыдущих стадий сперматогенеза. Так, если после 1-го и 2-го спаривания величина постимплантационной эмбриональной смертности составила около 20%, то после 3-го и 4-го – она возросла до 46-78,8%.

Ключевые слова: острая гипобарическая гипоксия, репродуктивная функция, крысы, мыши.

Введение

Гаметогенез является сложным энергозависимым процессом, весьма чувствительным к дефициту кислорода, что обуславливает его высокую ранимость при различных ишемических и гипоксических воздействиях. В настоящее время актуальным и недостаточно изученным являются последствия влияния острой

гипоксии на репродуктивные клетки млекопитающих. Определенный интерес в этом аспекте представляет работа [5], в которой проводилось изучение последствий острой гипобарической гипоксии на процессы сперматогенеза у крыс. Отмечено, что начиная с 3 суток эксперимента, наблюдалось значительное уменьшение количества всех типов клеток спермато-

генного эпителия, а на 14-е сутки наблюдения у всех животных в ткани тестикул отсутствовали ранние сперматиды, а клетки Лейдига были обнаружены только у 20% экспериментальных животных. Вероятно, это единственная работа, где проводилось изучение влияния острой гипобарической гипоксии на процессы сперматогенеза у млекопитающих. Вместе с тем, следует отметить, что в ней исследовали и сопоставляли эффект острой гипоксии только в процессе формирования половых клеток.

Учитывая отсутствие работ по планируемой теме, **целью** наших исследований было изучить влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки самцов крыс и мышей между второй – началом третьей недели постгипоксического периода.

Материалы и методы

Для исследования последствий влияния острой гипобарической гипоксии на репродуктивные клетки половозрелых самцов крыс и мышей подвергали воздействию острой гипоксии. Начиная с 1 суток, к каждому самцу на ночь подсаживали виргинных самок (в соотношении 1:1 у крыс и 2:1 у мышей), чтобы иметь фиксированную беременность. Для этого утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс и влагалищных пробок у самок мышей отбирали и вели отсчет срока беременности. Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили путем вскрытия самок крыс на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены самки крыс и мышей, у которых полностью отсутствовали им-

плантанты. Таким образом, было исследовано 80 самок крыс и 60 самок мышей в опыте, 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), 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 гипоксии на мужские репродуктивные клетки крыс и мышей.

Моделирование острой гипобарической гипоксии для самцов крыс осуществляли в барокамере при разрежении атмосферы в 145 мм рт.ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. Подъем на «высоту» длится 1 мин, у низкоустойчивых 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 самца на критическую «высоту», и с момента, когда он начинал биться в агонии, во избежание его гибели, «опуска-

ли» до предельной для него «высоты» – 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин. Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на самцов мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

С целью изучения последствий влияния острой гипоксии на мужские репродуктивные клетки, молодых половозрелых самцов крыс и мышей подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии и на 9-18 дни постгипоксического периода спаривали с виргинными самками (по видам). Для учета уровня

эмбриональной смертности в утробном периоде развития самок крыс вскрывали на 20-й день, самок мышей – на 19-й день беременности. Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Полученные данные позволили установить, что число имплантатов на самку крыс в опыте составило, в среднем, 9,16, в контроле – 10,98; у мышей – соответственно – 7,34 и 7,74. Расчет, произведенный по формуле (предложенной нами), показал, что потери на доимплантационном периоде развития (Р) составили у крыс 16,6%, у мышей – 5,2%.

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

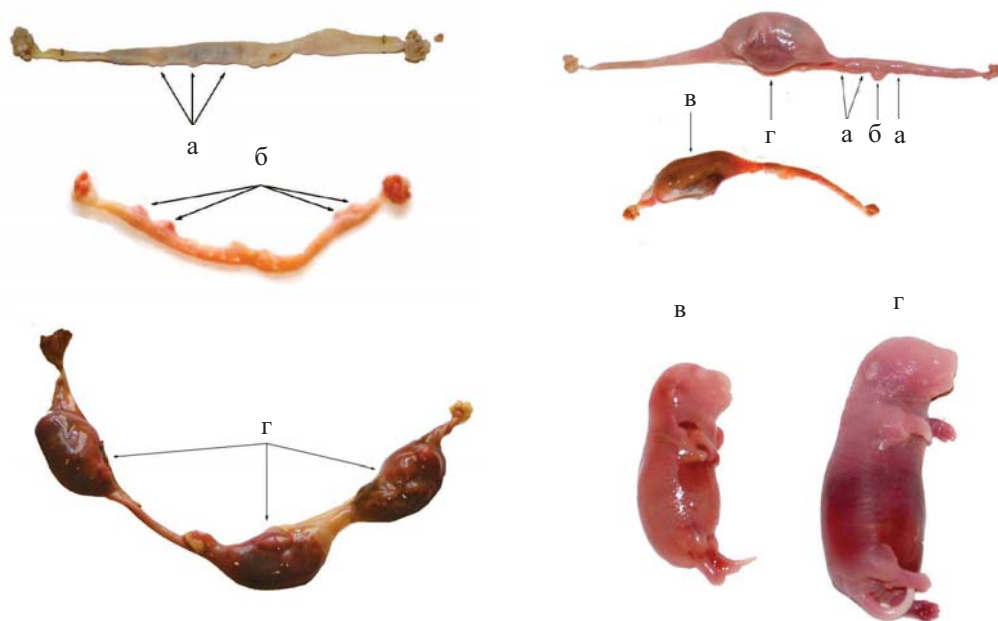


Рис. 1. Потомство самцов, подвергшихся острому гипоксическому стрессу (вскрытие на 20 день):

А – эмбрионы, погибшие в период имплантации 4-6 день развития;

Б – погибшие на 7-8 день;

В – гибель эмбрионов наступила на 15-17 день развития;

Г – эмбрионы, перенесшие острую гипоксию.

Таблица 1

**Последствия влияния острой гипобарической гипоксии
на репродуктивные клетки самцов крыс и мышей**

Показатель	Крысы		Мыши	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Число самок	80	50	60	50
Число мест имплантаций	733	549	440	387
Среднее число эмбрионов на 1 самку (M±m)	9,16±0,33	10,98±0,24	7,34±0,22	7,74±18
Коэффициент вариации	28,7	19,3	30,7	18,3
Число живых эмбрионов	496	521	263	358
Среднее число живых эмбрионов на 1 самку	6,2±0,27	10,42±0,21	4,38±0,31	7,16±0,19
Коэффициент вариации	45,4	20,76	54,65	16,17
Мертвых эмбрионов всего	237	28	177	29
% от общего числа	32,3	5,1	40,2	7,4
В т.ч. спонтанная эмбриональная смертность (%)		5,1		7,4
В т.ч. % погибших от гипоксии	27,2		32,8	

Значительное превышение доимплантационных потерь у самок крыс могло быть обусловлено разницей в чувствительности поздних сперматид, в результате которой зрелые сперматозоиды оказались неспособными оплодотворить яйцеклетки, либо оплодотворенные ими зародыши почему-то не получили дальнейшего развития, в любом варианте они вызваны под воздействием гипоксии.

Согласно результатам проведенного анализа, посимплантационная эмбриональная смертность у самок крыс опытной группы, в целом, составила 32,3%, у мышей – 40,2%. Однако учитывая, что спонтанная постимплантационная эмбриональная смертность у крыс была равна 5,1%, у мышей – 7,4%, то реальная смертность эмбрионов, обусловленная влиянием острой гипоксии, у самок крыс составила 27,2%, у мышей – 32,8%. Следовательно, суммарная эмбриональная смертность, вызванная влиянием острой гипобарической гипоксии, у крыс равна 43,8%, у мышей – 38,0%.

Ранее [3], исследуя частоты транслокаций, индуцированных Химическим мутагеном (тио-ТЭФ) в половых клетках самок и самцов мышей, нами было установлено, что они практически равны. В то же время, под воздействием острой гипобарической гипоксии чувствительность репродуктивных клеток, выраженная в эмбриональной смертности потомства, у самок [3] и самцов (в настоящем эксперименте) крыс имела значительные расхождения. Так, если под влиянием острой гипоксии на репродуктивные клетки самок постимплантационная эмбриональная смертность была равна 32,89%, то у самцов она равнялась 27,2%, суммарная эмбриональная смертность составила, соответственно, 47,16% и 43,80%. Есть основание предположить, что расхождение по уровню эмбриональной смертности у самок крыс, обусловленное влиянием острой гипоксии на половые клетки самок и самцов, вызвано физиологическими особенностями реализации последних.

Известно, что период дифференциации мужских и женских генеративных клеток протекает постоянно. При этом, если женские половые клетки каждой стадии овогенеза, овулируясь, покидают половые пути самки, то у самцов это происходит только лишь при спаривании с самками. Во всех остальных случаях сперматозоиды скапливаются в семяприемнике, что ведет к наложению одной стадии сперматогенеза на другую. Чтобы уменьшить погрешность, обусловленную этим процессом, при постановке эксперимента на чувствительность мужских половых клеток той или иной стадии сперматогенеза предварительно проводят «очистку» семяприемника самца. С целью изучения связи между степенью «очистки» самца от сперматозоидов предыдущих стадий, определяемой числом спариваний его с самками и уровнем эмбриональной смертности, нами был проведен дифференцированный учет постимплантационной эмбриональной смертности у крыс, результаты которого представлены в табл. 2 и на рис. 2.

Таблица 2
Зависимость эмбриональной смертности потомства от числа спариваний самцов, подвергшихся острой гипобарической гипоксии

Число спариваний самца	Общее число имплантатов	В т.ч. мертвых эмбрионов	Доля погибших эмбрионов (%)
1	247	29	11,7
2	213	42	19,7
3	150	69	46,0
4	123	97	78,8

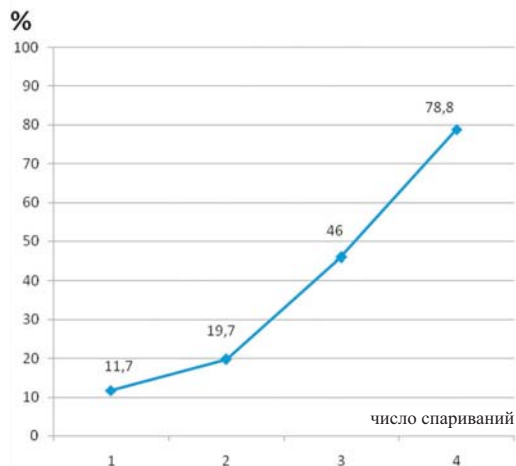


Рис. 2. Характер зависимости уровня эмбриональной смертности потомства от числа спариваний самцов, перенесших острый гипоксический стресс.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии прямой зависимости уровня гибели эмбрионов от числа спариваний самца. Так, если после первого и второго спаривания смертность эмбрионов не превышала 20%, то после 3-го 4-го она достигла 46-78,8%. И, наконец, необходимо указать, что в настоящем эксперименте, также как и в предыдущей нашей работе [3], число «прохолостившихся» по неустановленным причинам самок крыс в опыте составило 23, самок мышей – 12 особей.

Выводы

В настоящей работе исследованы последствия влияния острой гипобарической гипоксии на мужские половые клетки лабораторных крыс и мышей. Установлено, что острая гипоксия оказала существенное влияние на мужские репродуктивные клетки крыс и мышей, вызывая высокую эмбриональную

смертность на постимплантационной стадии развития.

Уровень смертности эмбрионов после имплантации под воздействием острой гипоксии у крыс составил 27,2%, у мышей – 32,8%. Доля потерь на доимплантационной стадии у самок крыс опытных групп была равна 16,6%, у мышей – 5,2%. Следовательно, суммарные потери, обусловленные влиянием острой гипобарической гипоксии на мужские репродуктивные клетки, составила у крыс 43,8%, у мышей – 38,0%. Экспериментально установлено также, что уровень постимплантационной эмбриональной смертности находится в прямой зависимости от «качества очистки» (числа спариваний) самца от сперматозоидов предыдущих стадий сперматогенеза. Так, если после 1-го и 2-го спаривания величина постимплантационной эмбриональной смертности составила около 20%, то после 3-го и 4-го она возросла до 46-78,8%

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. 2013. № 1. С. 7-17.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль – 2С. 2010. 358 с.
3. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н. 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 // Биомедицина. № 2. 2014. С. 80-85.
4. Семенов Х.Х., Малащенко А.М. Поиск гетерозиготных по транслокациям самок мышей среди потомков от самцов, подвергнутых воздействию химического мутагена (тио-ГЭФ) // Цитология и генетика. № 5. - Киев. 1977. С. 454-457.
5. Шевантаева О.Н., Рыжаков Д.И., Косюга Ю.И., Баландина М.В. Возможность коррекции нарушений сперматогенеза после острой гипобарической гипоксии / Мат-лы 4-ой Российской конф. - М. 2005. С. 120-121.
6. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Гананольский В.П., Ржепецкая М.К. Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии // Биомедицина. № 4. 2013. С. 29-45.

Influence of a sharp hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice

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

Work is devoted to research of consequences of influence of a sharp hypobaric hypoxia on reproductive cages of males of laboratory rats and mice. In experiment the rats of the HY/Y line, low-steady against a hypoxia brought and supported in SCBMT of FMBA of Russia and a mouse of the C57BL/6Y line supported also in our Center were used. Young sexually mature of males of rats and mice, having subjected to influence of a sharp hypobaric hypoxia, for 9-18 days of the post-hypoxemic period coupled to virginny females. For identification of consequences of acute hypoxemic stress on man's gametes, the accounting of embryonic mortality in the uterine period of development carried out, opening females for 19-20 days of pregnancy. It is established that at the general mortality of embryos in the post-implantation period of development in 32,3% in females of rats and in 40,2% at females of mice, the share of mortality of embryos caused by influence of a sharp hypoxia made 27,2% and 32,8%, respectively. Losses from among the ovulated ova at a preimplantation stage at females in experience made at rats – 16,6%, at mice – 5,2%. Thus, total losses under the influence of a sharp hypoxia on man's reproductive cages were equal at females of rats 43,8%, at females of mice – 38,0%. It is experimentally established also that the level of post-implantation embryonic mortality is in direct dependence on "quality of cleaning" (number of pairings) of a male on spermatozoa of the previous stages of a spermatogenesis. So, if after the 1st and 2nd pairing the size of post-implantation embryonic mortality made about 20%, after the 3rd and 4th – it increased to 46-78,8%.

Key words: sharp hypobaric hypoxia, reproductive function, rats, mice.