

На правах рукописи

ШЕВАНТАЕВА
Ольга Николаевна

**СПЕРМАТОГЕНЕЗ ПОСЛЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ
И ИШЕМИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО
МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.03.03. – патологическая физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Н.Новгород - 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Научный консультант: Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Дмитрий Иванович Рыжаков

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук,
профессор Иван Васильевич Радыш,
доктор медицинских наук,
профессор Сергей Викторович Пирожков,
доктор медицинских наук,
профессор Сергей Петрович Перетягин.

Ведущая организация:
Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н. И. Пирогова

Защита состоится «_25_»_апреля_2012 г. в 13____ часов
На заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском
Университете дружбы народов по адресу:
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского
Университета дружбы народов по адресу:
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан «___»_____2012г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Г.А. Дроздова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важнейшим стратегическим направлением социальной политики государства является сохранение и укрепление здоровья населения, возрастная структура которого неуклонно смещается в сторону старших возрастов [В.В. Шкарин, 2006]. В стране снижается количество людей фертильного возраста и детского населения [А.А. Артюхин, 2006]. В последние годы в публичных выступлениях представителей министерств и ведомств часто звучат тезисы о том, что причиной демографического кризиса и депопуляции нации является исключительно социально-экономическая ситуация в стране. С таким мнением можно согласиться только отчасти. По данным многих исследователей [В.А. Черешнев, 2005, А.А. Артюхин, 2007, М.Н. Тарасова, 2008], частота бесплодных браков в России превысила критический уровень — 15% и имеет тенденцию к росту. Мужской фактор бесплодного брака составляет от 40 до 60% [А.А. Артюхин, 2003, В.В. Евдокимов, 2010]. Таким образом, причиной нерождения примерно 10% детей (около 3,5 – 4,0 млн. детей за последние 15 – 20 лет) является мужская инфертильность. Такие демографические потери в масштабах РФ с учетом населения среднестатистической области европейской части страны (в среднем 1,5- 2,0 млн. человек) можно считать катастрофическими [С.А. Магомедова, 2009]. В этой связи вопросы изучения репродуктивного здоровья мужчин являются актуальными. Охрана репродуктивного здоровья населения России и повышение рождаемости объявлена руководством страны важнейшей государственной задачей и является одной из приоритетных составляющих Национального проекта «Здоровье».

Предметом дискуссий последних лет является вопрос о причинах наблюдающегося у мужчин снижения количества и качества семенной жидкости [Н. Fisch, 1996, В. Eskenazi, 2005, С.И. Гамидов, 2010]. Подобные факты были выявлены при отборе доноров для создания банков спермы. При этом сперма только 10-16% привлеченных к донорству мужчин оказалась пригодной для искусственного оплодотворения. Более 85% мужчин имели стойкие изменения показателей семенной жидкости. Многочисленными исследованиями показано, что снижение фертильности у мужчин связано с возрастающим воздействием на организм человека вредных факторов, встречающихся в окружающей природной среде, на производстве и в быту [В.Л. Быков, 2000, N. Naha, 2006, Т.Е. Потемина, 2007, М.Р. Safarinejad, 2009].

Второй причиной снижения рождаемости является «сверхсмертность» в репродуктивном (трудоспособном) возрасте [В.Ф. Галецкий, 2005, Б.Б. Прохоров, 2006]. Это подтверждается анализом темпов роста возрастных коэффициентов смертности в стране в течение двух последних десятилетий. К 2006 г. в наибольшей степени возрос уровень смертности населения рабочих возрастов. Максимум роста смертности приходится на возраст 25-39

лет. Причем, «сверхсмертность» мужчин трудоспособного возраста в 3,8 раза выше, чем у женщин [А.Н. Гуров, 2009]. В структуре причин смерти мужчин трудоспособного возраста в течение многих лет первое место занимают внешние причины (несчастные случаи, отравления, травмы), второе - болезни системы кровообращения [Г. И. Тихонова, 2009]. Общеизвестно, что в этих случаях своевременное и квалифицированное оказание медицинской помощи в отделении интенсивной терапии, анестезиологии и реанимации влияет на продолжительность жизни. Однако при этом может страдать качество жизни. Реанимационное вмешательство, прервав умирание, обеспечивает восстановление функций организма и, как правило, запускает ряд новых патологических процессов. Так, реоксигенация и рециркуляция после остановки сердца не только ликвидируют последствия первичного патогенного воздействия, но и вызывают каскад новых патологических изменений [В.А. Неговский, 1996].

Последние два десятилетия ознаменовались существенными достижениями в области экспериментальной и клинической реаниматологии [В.Т. Долгих, 2008]. Значительное число работ посвящено изучению механизмов постреанимационной патологии жизненно важных органов [В.В. Лобов, 1998, Г.В. Алексеева, 2002, Н.Н. Андреева, 2007, В.Т. Долгих, 2008] и вопросов, касающихся поиску эффективных методов и средств, позволяющих сохранить структурно-функциональную целостность мембран клеток в постреанимационном периоде. При этом упускаются из вида вопросы сохранности репродуктивной системы. Это обстоятельство (нарушение репродуктивной функции) оказывается чрезвычайно важным, поскольку вне зависимости от социальных и демографических условий для каждого человека невозможность иметь собственного ребенка является тяжелым жизненным испытанием, приводящим к дисгармонии брака и распаду семьи.

Цель исследования: Изучить состояние сперматогенеза, механизмы его повреждения и восстановления после терминальных состояний различного генеза и обосновать концепцию раннего применения антигипоксантов метаболического типа.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести комплексное цитологическое исследование ткани семенников в совокупности с изучением характеристик эякулята у самцов белых крыс после моделирования терминальных состояний, вызванных острой гипобарической гипоксией или путем полного пережатия сердечно-сосудистого пучка.

2. Изучить в сравнительном аспекте ранние постреанимационные изменения сперматогенеза после моделирования терминальных состояний.

3. Оценить зависимость ранних постреанимационных изменений сперматогенеза от степени перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и общей антиоксидантной активности ткани тестикул.

4. Выяснить роль лактата и пирувата как энергетических субстратов для поддержания метаболизма герминативных клеток семенников.

5. Изучить возможности фармакологической защиты сперматогенеза в постреанимационном периоде и провести сравнительный анализ эффектов раннего введения актовегина или мексидола на сперматогенез.

Научная новизна. Впервые получены экспериментальные данные о степени нарушений сперматогенеза в зависимости от модели терминального состояния. Установлено, что после клинической смерти, вызванной пережатием сердечно-сосудистого пучка, возникали более глубокие нарушения гаметогенеза, чем после моделирования острой гипобарической гипоксии.

Впервые на основе комплексного изучения количественных показателей клеточного состава семенников в сопоставлении с параметрами окислительной модификации протеинов, перекисного окисления липидов и общей активности антиоксидантной системы показано, что гибель значительной части клеток тестикул в раннем постреанимационном периоде, обусловлена усилением свободнорадикального окисления. Отмечено, что низкая антиоксидантная активность в поздние сроки наблюдения связана с абсолютным снижением количества клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига.

Впервые выявлены корреляционные связи между состоянием перекисного окисления липидов и окислительной модификации протеинов в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде, позволившие теоретически обосновать раннее применение метаболических препаратов для уменьшения повреждений сперматогенного эпителия.

Впервые на модели терминального состояния, вызванного острой гипобарической гипоксией, установлена адаптивная роль лактата в раннем постреанимационном периоде. Лактат поддерживает жизнеспособность клеток сперматогенного эпителия и стимулирует процессы деления клеток в течение первых суток.

Установлена более высокая эффективность препаратов из группы стимуляторов регенерации, одним из которых является актовегин, по сравнению с мексидолом, для формирования устойчивых защитно-компенсаторных реакций в ткани тестикул. Показано, что введение актовегина в раннем постреанимационном периоде снижает уровень свободнорадикальных процессов и сохраняет высокие концентрации лактата в ткани семенников, что способствует более быстрому восстановлению сперматогенеза.

Теоретическая и практическая значимость. Проведенное исследование расширяет теоретические представления о повреждающем влиянии экстремальных гипоксических и ишемических воздействий на мужскую репродуктивную систему.

Предпринятые исследования носят не только фундаментальный, но и прикладной характер, раскрывая ранее неизвестные механизмы повреждения клеток сперматогенного эпителия в постреанимационном периоде, что и определяет их практическую ценность. Полученные результаты в перспективе могут служить основой для поиска новых или ранее не использовавшихся в комплексе реанимационных мероприятий фармакологических препаратов, что позволит ускорить реабилитацию больных, перенесших клиническую смерть. Это может оказаться чрезвычайно важным для молодых пациентов в плане их социальной адаптации и последующей жизни.

Положения, выносимые на защиту:

1. Терминальные состояния и последующая реанимация сопровождаются существенными нарушениями процессов сперматогенеза. Более выраженные нарушения сперматогенеза отмечаются после моделирования клинической смерти, чем после моделирования острой гипобарической гипоксии.

2. Нарушение сперматогенеза в раннем постреанимационном периоде связано с изменением метаболизма и активацией свободнорадикальных процессов в ткани тестикул, что сопровождается уменьшением количества клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига.

3. Высокая концентрация лактата в ткани тестикул в раннем постреанимационном периоде является основным фактором, предохраняющим клетки сперматогенного эпителия от гибели в условиях оксидативного стресса.

4. Раннее применение метаболических препаратов с комплексными антигипоксическими и антиоксидантными свойствами способствует сохранению на более высоком уровне количества клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига в постреанимационном периоде, что в дальнейшем способствует быстрым восстановительным процессам.

5. Применение актовегина в постреанимационном периоде создает лучшие условия для формирования защитно-приспособительных реакций в ткани семенников, чем введение мексидола.

Внедрение: Результаты исследований используются в учебном процессе Нижегородской государственной медицинской академии, в научно-исследовательских работах НИИ ПФМ НижГМА. По материалам исследований написано учебно-методическое пособие «Влияние факторов внешней среды на мужскую репродуктивную систему» (2006).

Апробация работы: Основные положения диссертации доложены и обсуждены на втором Российском конгрессе по патофизиологии (Москва, 2000), XI международном симпозиуме «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 2003), третьем Российском конгрессе по патофизиологии (Москва, 2004), IV - V Российской конференциях «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» с международным участием (Москва,

2005, 2008), VIII World congress of adaptive medicine (Moscow, 2006), XII Международном симпозиуме «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 2007), V Российская конференция «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2008).

Личный вклад:

Автором лично проведено моделирование острой гипобарической гипоксии (462 животных). Всем животным, включая крыс после моделирования клинической смерти (334 животных) и интактных животных (60 животных), проводилось исследование мазковых препаратов ткани семенников, подсчет сперматограммы; изучение характеристик эякулята и подсчет спермограммы. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка результатов исследования.

При непосредственном участии автора моделирование клинической смерти и биохимические исследования проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории «НижГМА Росздрава» (зав. д.б.н., проф. И.В. Мухина) и на кафедре клинической лабораторной диагностики «НижГМА Росздрава» (зав. д.б.н., проф. К.Н. Конторщикова).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 27 работ. Из них 11 – в журналах, рецензируемых ВАК РФ, 1 монография.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 272 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, библиографического указателя, который включает 301 источник (из них иностранных 179). Работа иллюстрирована 54 рисунками и 58 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 856 половозрелых самцах белых беспородных крыс массой от 180 до 235 граммов в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983, № 267 МЗ РФ от 19.06.2003, «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденных МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

На модели терминального состояния, вызванного острой гипобарической гипоксией, выполнены 5 серий экспериментов:

1 серия – Изучение клеточного состава семенников, характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул в постреанимационном периоде после моделирования острой гипобарической гипоксии (148 животных).

2 серия - Исследование клеточного состава семенников, характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул при однократном в/б введении актовегина в дозе 10 мг/кг в ходе реанимационных мероприятий после моделирования острой гипобарической гипоксии (147 животных).

3 серия - Исследование клеточного состава семенников, характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул при однократном в/б введении мексидола в дозе 50 мг/кг в ходе реанимационных мероприятий после моделирования острой гипобарической гипоксии (147 животных).

4 серия - Исследование клеточного состава семенников при однократном в/б введении актовегина в дозе 10 мг/кг массы через сутки после моделирования острой гипобарической гипоксии (10 животных).

5 серия - Исследование клеточного состава семенников при однократном в/б введении мексидола в дозе 50 мг/кг массы через сутки после моделирования острой гипобарической гипоксии (10 животных).

На модели терминального состояния, вызванного пережатием сердечно-сосудистого пучка, выполнены 3 серии экспериментов:

1 серия – Изучение клеточного состава семенников, характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул в постреанимационном периоде после моделирования клинической смерти (112 животных).

2 серия – Исследование клеточного состава семенников, характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул при однократном в/б введении актовегина в дозе 10 мг/кг в ходе реанимационных мероприятий после моделирования клинической смерти (111 животных).

3 серия - Исследование клеточного состава семенников, характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул при однократном в/б введении мексидола в дозе 50 мг/кг в ходе реанимационных мероприятий после моделирования клинической смерти (111 животных).

В 4-й и 5-й сериях экспериментов после моделирования острой гипобарической гипоксии изучение клеточного состава семенников проводилось в сроки 7 и 60 суток. В остальных сериях экспериментов изучение состояния сперматогенеза, количественных и качественных характеристик эякулята и биохимических показателей ткани тестикул проводилось в следующие сроки: 40 мин., 24 часа, 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60 сутки после экстремальных гипоксических и ишемических воздействий.

Контрольную группу составили интактные животные (60 животных) того же возраста и приблизительно такого же веса, что и опытные. В ходе экспериментов установлено, что показатели сперматогенеза, а также биохимические показатели тканей тестикул у интактных животных не имели достоверных различий в пределах сроков наблюдения.

Моделирование острой гипобарической гипоксии осуществляли в проточной барокамере при внешней температуре 20–22⁰С. Крыс помещали в условия, соответствующие «подъему» на высоту 11 500 – 12 000 метров со

средней скоростью ~ 183 м/с [Л.Д. Лукьянова, 1990]. Животные находились на «смертельной площадке» до появления агонального дыхания.

Клиническую смерть воспроизводили путем полного пережатия сосудистого пучка сердца внутриторакально без вскрытия грудной клетки и без пневмоторакса [В.Г. Корпачев и др., 1982].

Для оценки состояния сперматогенеза использовали количественный цитологический метод [Ю.В. Иванов, 1986], который заключается в приготовлении мазков из клеточной суспензии ткани семенников и окрашивании их по Романовскому-Гимзе. В условиях световой микроскопии с использованием масляной иммерсии при увеличении микроскопа об. 90 х ок. К-15 производили подсчет отдельных типов клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига, общим количеством - 500. По результатам подсчетов составлялась сперматограмма – процентное соотношение различных типов клеток тестикул. Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия в 1 г тестикулярной ткани вычисляли путем математических пропорций, используя абсолютное число сперматозоидов, подсчет которых проводился в камере Горяева.

Эякулят для исследования получали методом электростимуляции семенного бугорка через слизистую прямой кишки [Д.И. Рыжаков, С.Б. Артифексов, А.В. Молодюк, 1980]. Параметры электростимуляции: амплитуда 2,5 - 6 В, частота 0,8 - 1 Гц, длительность импульсов 0,1 - 0,5 мсек, длительность стимуляции до 120 сек, форма импульсов - прямоугольная. Стимуляция проводилась в утренние часы для исключения влияния суточного колебания уровня половых гормонов.

Подсчет количества сперматозоидов в эякуляте проводили в камере Горяева. Раздельно учитывались сперматозоиды с поступательным движением (нормокинезис), совершающие колебательные движения (гипокинезис) и неподвижные сперматозоиды (акинезис).

Состояние прооксидантной системы оценивали по следующим показателям:

- Наличие свободных радикалов в ткани тестикул определяли методом хемилюминесценции [Е.И. Кузьмина, 1983] на приборе БХЛ-06. Информационными показателями считали: I_{\max} - максимальная интенсивность свечения исследуемой пробы, измеряемая в mV, отражающая свободнорадикальную активность образца и светосумма хемилюминесценции за определенное время (S), которая отражает общую активность антиоксидантных систем защиты.

- Содержание первичных продуктов липопероксидации (диеновых конъюгатов – ДК, триеновых конъюгатов – ТК) оценивалось методом ультрафиолетовой спектроскопии на спектрофотометре СФ-26 фирмы «ЛОМО» (г.Санкт-Петербург). Основания Шиффа (ОШ) оценивались с помощью серийный отечественного прибора «Флуориметр РФ» (Москва). Применялся флуориметрический метод D.L.Fletcher et al., (1973).

Концентрацию ДК, ТК и ОШ выражали в относительных единицах оптической плотности на грамм ткани.

- Определение окислительной модификации белков (ОМБ) проводилось по уровню карбонильных производных, выявляемых в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [Е.Е. Дубинина, 1995]. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре АРЕL PD-303, для алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера при длинах волн 356, 363, 370 нм, основного характера – при 430 и 530 нм. Полученные данные выражали в ед.опт.пл/г белка.

Количественное определение пирувата и лактата в ткани семенников проводили энзиматическим методом с использованием лактатдегидрогеназы [В.С. Асантин, 1965]. О количестве лактата судили по уровню образовавшегося восстановленного никотинамидаденин-динуклеотида, о количестве пирувата по убыли НАДН, регистрируемого на спектрофотометре при длине волны 340 нм. Содержание пирувата и лактата выражали в мкмоль/г ткани.

Полученные данные были обработаны с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Для оценки вероятности различий между контрольными и опытными группами использовали U-критерий Манна-Уитни, независящий от формы распределения в группе. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для анализа взаимосвязи двух признаков использовали корреляционный анализ по Спирмену. О характере связи судили по знаку и абсолютной величине коэффициента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ состояния сперматогенеза после перенесенных терминальных состояний

Проведенные нами исследования выявили безусловную связь нарушений сперматогенеза с экстремальными гипоксическими и ишемическими воздействиями. В таблице 1 представлена динамика изменений количества всех типов клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига в разные сроки после моделирования терминальных состояний, вызванных острой гипобарической гипоксией и пережатием сердечно-сосудистого пучка. Данные экспериментальных исследований показывают, что выраженные различия в клеточном составе семенников отмечаются уже через 24 часа после моделирования терминальных состояний. Так, после моделирования клинической смерти наблюдалось значительное снижение количества всех типов клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига. В то время как после моделирования острой гипобарической гипоксии количество сперматогоний, сперматозоидов, клеток Сертоли и Лейдига оставалось в пределах нормы, а количество сперматоцитов выросло по сравнению с контролем. Сниженным было лишь количество ранних и поздних сперматид.

Таблица 1

Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия, клеток Сертоли и клеток Лейдига в ткани семенника самцов белых крыс после моделирования острой гипобарической гипоксии и клинической смерти (M ± m)

Изучаемые показатели (млн/1000 мг)		контроль	40 минут	24 часа	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки	45 сутки	60 сутки
Сперматогонии	ОГГ	27,8±1,1	26,0 ± 1,4	25,8 ± 1,3	2,3±0,1*	1,2±0,1*	0,8±0,05*	2,1 ± 0,1*	3,1 ± 0,1*	4,2 ± 0,2*	5,2±0,2*
	КС		27,0 ± 1,4	1,8 ± 0,1* ^b	1,7±0,4* ^{bbb}	0,7 ± 0,1* ^{bb}	0,3±0,04* ^b	1,3±0,1* ^{bb}	1,6 ± 0,1* ^b	2,1 ± 0,2* ^b	3,3 ± 0,2* ^b
Сперматоциты	ОГГ	132,2±7,5	124,0±4,8	260,7±10,0*	8,9±0,4*	4,6±0,3*	5,4 ± 0,4*	7,5 ± 0,5*	12,7±0,3*	19,5±1,6*	23,0±1,3*
	КС		138,0 ± 8,8	1,4 ± 0,3* ^b	0,8 ± 0,2* ^b	0* ^b	0* ^b	1,5 ± 0,1* ^{bbb}	1,6 ± 0,2* ^b	3,0 ± 0,2* ^b	8,0 ± 0,5* ^b
Сперматиды ранние	ОГГ	142,3±6,2	131,9±5,0	51,2 ± 1,9*	1,1±0,1*	0,4±0,05*	0*	2,3 ± 0,2*	3,6 ± 0,4*	9,2 ± 0,7*	13,5±0,5*
	КС		138,0 ± 8,8	1,4 ± 0,3* ^b	0,8 ± 0,2*	0* ^b	0*	1,5 ± 0,1* ^b	1,6 ± 0,2* ^b	3,0 ± 0,2* ^b	8,0 ± 0,5* ^b
Сперматиды поздние	ОГГ	147,9±5,5	141,6±3,2	73,7 ± 1,9*	5,4±0,2*	2,8±0,1*	1,6 ± 0,1*	4,1 ± 0,3*	12,2 ± 0,5*	18,9 ± 1,1*	23,2±0,7*
	КС		144,1 ± 8,0	3,2 ± 0,4* ^b	2,6 ± 0,3* ^b	2,2 ± 0,1* ^{bbb}	1,0 ± 0,1* ^{bb}	2,7 ± 0,2* ^{bb}	7,4 ± 0,3* ^b	7,8 ± 0,3* ^b	12,9±0,7* ^b
Сперматозоиды	ОГГ	81,0 ± 1,6	79,5±1,2	78,5 ± 1,8	32,0±1,7*	21,0±1,2*	12,5 ± 0,8*	30,5 ± 1,2*	33,5 ± 1,3*	33,0 ± 1,1*	39,0±1,2*
	КС		80,7 ± 1,3	19,3 ± 1,7* ^b	13,6±1,4* ^b	12,9±1,5* ^b	11,4 ± 0,9	25,0 ± 2,2*	30,7 ± 1,7*	30,0 ± 2,2*	32,9±2,1* ^{bbb}
Клетки Сертоли	ОГГ	42,4 ± 1,8	42,4±2,8	41,3 ± 2,3	6,1±0,2*	3,4 ± 0,2*	1,8 ± 0,1*	4,3 ± 0,3*	6,7 ± 0,4*	8,1 ± 0,5*	9,7±0,4*
	КС		42,1 ± 3,8	3,7 ± 0,5* ^b	3,6 ± 0,6* ^{bb}	2,9 ± 0,1*	1,1 ± 0,1* ^{bb}	2,7 ± 0,2* ^{bb}	3,8 ± 0,3* ^{bb}	4,1 ± 0,2* ^b	6,8 ± 0,5* ^{bb}
Клетки Лейдига	ОГГ	8,1 ± 0,9	7,7±0,9	8,0 ± 0,8	0,6±0,1*	0,3±0,06*	0,03±0,02*	0,3 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*	1,0 ± 0,2*	1,4±0,1*
	КС		8,2 ± 1,4	0,4 ± 0,1* ^b	0,3±0,05* ^{bb}	0* ^{bbb}	0*	0*	0* ^{bb}	0,1 ± 0,1* ^{bb}	0,4 ± 0,1* ^b

Примечание: * - достоверность различий с интактными животными; p < 0,001

- ^b - достоверность различий в группах (ОГГ и КС), p < 0,001;
- ^{bb} - достоверность различий в группах (ОГГ и КС), p < 0,01;
- ^{bbb} - достоверность различий в группах (ОГГ и КС), p < 0,05

При исследовании механизмов клеточной гибели в раннем постреанимационном периоде было установлено, что показатель интенсивности хемилюминесценции (I_{\max}), отражающий суммарную активность свободнорадикального окисления на 40 минуте постишемического периода был в 1,6 раза выше ($p < 0,05$), чем у животных после моделирования острой гипобарической гипоксии (рис.1). При этом отмечен и более низкий общий уровень антиоксидантной защиты (рис. 2).

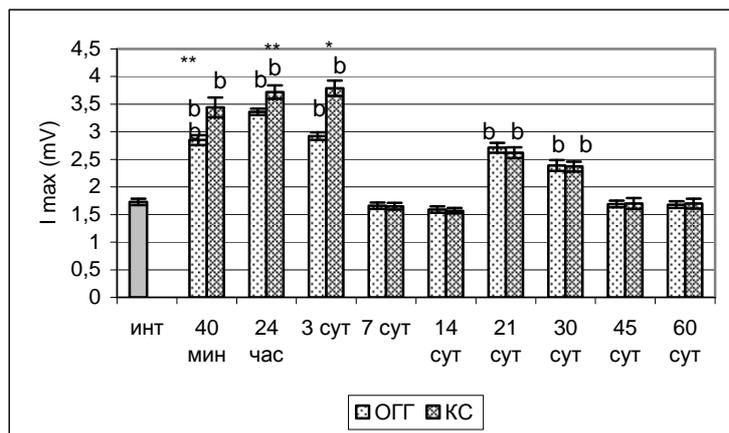


Рис.1. Соотношение уровней свободнорадикального окисления в ткани тестикул самцов белых крыс после моделирования терминальных состояний.

b - достоверность различий с интактными животными; $p < 0,05$
 *- достоверность различий в группах (ОГ и КС), $p < 0,001$;
 ** - достоверность различий в группах (ОГ и КС), $p < 0,05$.

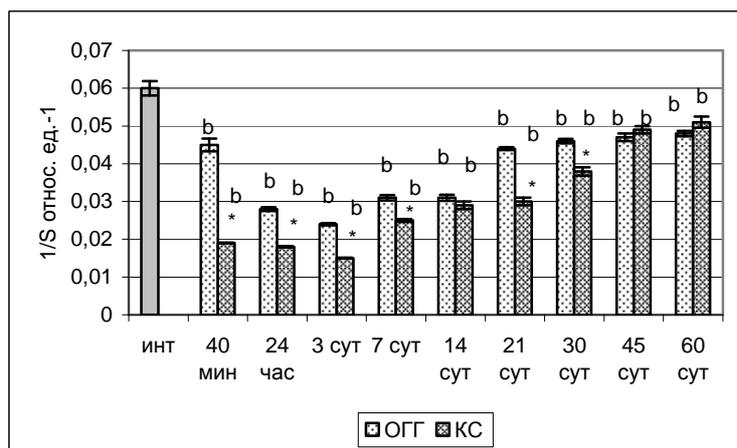


Рис. 2. Соотношение уровней активности антиоксидантной системы в ткани тестикул у самцов белых крыс после моделирования терминальных состояний.

b - достоверность различий с интактными животными; $p < 0,05$
 *- достоверность различий в группах (ОГ и КС), $p < 0,001$;

Известно, что образующиеся в клетке радикалы инициируют вторичные свободнорадикальные реакции, вступая во взаимодействие с различными клеточными компонентами: белками, нуклеиновыми кислотами и липидами [Т.В. Копытова, 2009]. Нами была проведена сравнительная оценка показателей окислительной модификации белка (ОМБ) в раннем постреанимационном периоде (40 минуты).

Как показали результаты исследований, динамика увеличения количества карбонильных производных ОМБ была более выраженной после моделирования клинической смерти, чем после острой гипобарической гипоксии (табл. 2). Так, количество динитрофенилгидразонов нейтрального характера (длина волн 356, 363, 370 нм) и основного характера (длина волн 430 нм) на 40 минуте постишемического периода было в 1,3 раза выше, чем в постгипоксическом.

Таблица 2

Изменение уровня окислительной модификации белка (ед.опт.пл/г белка) в ткани семенников самцов белых крыс в раннем постреанимационном периоде (M ± m)

Срок	Длина волны					
		356 нм	363 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Интактные	n = 4	6,58±1,09	6,70±1,03	6,79±0,98	3,59±0,44	0,50±0,03
40 минут	ОГГ n = 5	10,60±0,50*	11,01±0,49*	11,19±0,48*	6,26±0,35*	0,76±0,07*
	КС n = 5	14,76±0,4* ^b	14,69±0,39* ^b	14,91±0,46* ^b	7,97±0,32* ^b	0,73±0,05* ^b
24 часа	ОГГ n = 4	17,32±1,96*	17,87±2,04*	18,05±2,05*	10,59±1,23*	1,34±0,15*
	КС n = 4	18,69±0,94*	19,31±0,89*	19,5±0,87*	10,74±0,61*	0,94±0,14*
3 сутки	ОГГ n = 4	5,58±1,21	5,94±1,22	6,17±1,22	3,19±0,73	0,43±0,16
	КС n = 4	8,53±1,83	8,93±1,88	9,11±1,91	4,49±0,61	0,29±0,07

Примечание: * - достоверность различий с интактными животными; $p < 0,05$
^b - достоверность различий в группах (ОГГ и КС), $p < 0,05$

Образование карбонильных производных белков в раннем постреанимационном периоде может осуществляться не только путем прямого окисления аминокислотных остатков, но и при взаимодействии белков с продуктами липопероксидации [Р.Н. Белоногов, 2009]. В ходе наших экспериментов был выявлен достоверно значимый корреляционный индекс между производными ОМБ и продуктами ПОЛ ($r = 0,94 - 0,67$). Кроме того, установлено, что более интенсивное накопление продуктов ПОЛ в мембранах клеток наблюдалось после ишемического воздействия (табл. 3).

Согласно полученным нами данным, на 40 мин постреанимационного периода после моделирования клинической смерти уровень ДК был выше в 2,4 раза, ТК – в 3 раза и ОШ – в 1,7 раза, чем после гипоксического воздействия ($p < 0,05$).

Таким образом, на 40 минуте после оживления формируется состояние окислительного стресса, которое развивается в ткани семенников в результате дисбаланса между образованием свободных радикалов и эндогенными механизмами антиоксидантной защиты. Степень выраженности окислительного стресса зависит от вида терминального состояния. Представленные результаты свидетельствуют о том, что после пережатия сердечно-сосудистого пучка, приводящего к тотальной ишемии, окислительная модификация основных компонентов клеточной мембраны выше, чем после гипоксического воздействия. Следствием этого явилось значительное уменьшение количества всех типов герминативных клеток, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига через 24 часа после моделирования клинической смерти.

Таблица 3

Количество продуктов перекисного окисления липидов в ткани семенников самцов белых крыс в раннем постреанимационном периоде (M ± m)

Сроки наблюдения		ДК ед.опт.пл/г ткани	ТК ед.опт.пл/г ткани	ОШ ед.опт.пл/г ткани
Интakтные	n = 4	0,14 ± 0,003	0,05 ± 0,002	2,56 ± 0,67
40 минут	ОГГ n = 5	0,19 ± 0,004*	0,09 ± 0,01*	13,16 ± 0,73*
	КС n = 5	0,46 ± 0,05* ^b	0,28 ± 0,02* ^b	22,47 ± 2,47* ^b
24 часа	ОГГ n = 4	1,21 ± 0,25*	0,24 ± 0,04*	24,85 ± 1,56*
	КС n = 4	0,80 ± 0,05*	0,46 ± 0,02* ^b	37,26 ± 3,75* ^b
3 сутки	ОГГ n = 4	0,41 ± 0,07*	0,20 ± 0,04*	13,99 ± 2,45*
	КС n = 4	0,61 ± 0,13*	0,41 ± 0,09*	26,08 ± 1,93* ^b

Примечание: * - достоверность различий с интактными животными; $p < 0,05$
^b - достоверность различий в группах (ОГГ и КС), $p < 0,05$;

В дальнейших наших исследованиях было обнаружено, что на 40 минуте после моделирования клинической смерти концентрация лактата в ткани семенников была в 6,4 раза ниже, чем у интактных животных (рис. 3).

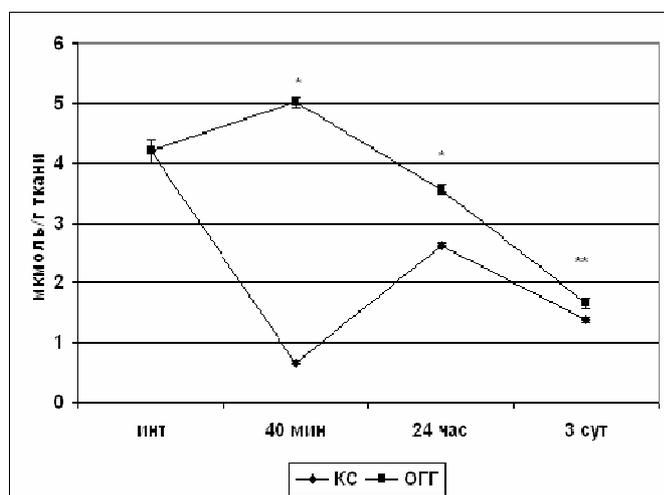


Рис.3. Уровень лактата в ткани тестикул самцов белых крыс в раннем постреанимационном периоде после моделирования терминальных состояний.

* - достоверность различий в группах $p < 0,001$,

** - достоверность различий в группах $p < 0,05$.

Это позволило предположить, что более значительные изменения количества клеток в ткани тестикул через 24 часа после моделирования клинической смерти могли быть обусловлены не только дисбалансом про- и антиоксидантной систем, но и снижением концентрации лактата в ткани семенников. Работами многих исследователей было доказано, что глюкоза и лактат служат энергетическими субстратами для созревающих половых клеток [M. Mita, P.F. Hall, 1982, N.H.P.M. Jutte, 1982, M. Nakamura, 1984]. Однако способность герминативных клеток использовать глюкозу очень

низкая [F. Boussouar, 2004]. Сперматогонии и сперматозоиды, имея высокую гликолитическую активность, могут утилизировать глюкозу [F. Boussouar, 2004]. Сперматоциты и сперматиды в качестве энергетического субстрата используют лактат [M. Mita, P.F. Hall, 1982, M. Nakamura, 1986, J.A. Grootegoed 1990, J.L. Courtens, 1999]. Лактат является основным фактором выживаемости для этих клеток в условиях гипоксии [K. Erkkila, 2006]. Поставщиками лактата являются клетки Сертоли [M. Vajpai, 1998, J.A. Grootegoed 1990, K. Erkkila, 2006]. Как показали R. Robinson and I.B. Fritz (1981), только 2,9% глюкозы в клетках Сертоли конвертируется до углекислого газа, а 95,8% - до лактата.

Низкий уровень лактата на 40 минуте реперфузионного периода, по нашему мнению, является отражением изменений, возникших в период ишемии, который характеризуется прекращением кровотока, а, следовательно, и поступлением глюкозы в клетки Сертоли, являющимися поставщиками лактата в просвет канальцев. Согласно мнению K. Ghabili et al. (2008), уменьшение доставки глюкозы к семенникам сопровождается снижением уровня лактата в них, что вызывает гибель клеток сперматогенного эпителия.

В отличие от клинической смерти, модель терминального состояния, вызванного острой гипобарической гипоксией, характеризуется снижением доставки кислорода в органы и ткани, при сохранении притока субстратов окисления и выведения токсичных продуктов метаболизма. На 40 минуте постреанимационного периода было обнаружено достоверное повышение концентрации лактата в ткани тестикул, что может указывать на активацию гликолиза в клетках Сертоли в связи с перенесенной острой гипоксией (рис. 3). Высокий уровень лактата в ткани тестикул способствовал тому, что через 24 часа количество сперматогоний, сперматозоидов оставалось в пределах нормы (табл. 1). K. Erkkilä et al. (2002) доказали, что лактат способен подавлять процессы клеточной гибели в тестикулах, независимо от уровня адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ). Известно также, что лактат является одним из предпочтительных метаболических субстратов для сперматоцитов, активизируя процессы клеточного деления. Результаты наших исследований показали, что количество сперматоцитов через 24 часа увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными. В работе N.H.P.M. Jutte et al. (1981) было показано, что под действием лактата активируется синтез РНК и белка в сперматоцитах.

Установлено [M. Mita, P.F. Hall, 1982, J. G. Farias, 2005], что сперматиды являются самыми аэробными клетками сперматогенного эпителия. Резкое снижение концентрации кислорода в крови и ткани семенников ведет к существенному снижению количества сперматид, отмеченному нами через сутки после моделирования терминального состояния путем создания острой гипобарической гипоксии (табл. 1).

Кроме того, количество сперматид напрямую зависит от концентрации лактата - их единственного энергетического субстрата. Сперматиды не могут

захватывать и расщеплять глюкозу до пирувата [N.H.P.M. Jutte, 1982]. Согласно данному положению можно предположить, что снижение концентрации лактата в семенниках, отмечаемое в течение первых суток после моделирования клинической смерти привело к значительной гибели сперматид через 24 часа постреанимационного периода (их количество было в 36 раз меньше, чем после моделирования острой гипобарической гипоксии).

Таким образом, высокая концентрация лактата в тканях тестикул в первые часы после острой гипобарической гипоксии обеспечивает относительную стабильность клеточного состава тестикул и инициирует деление сперматоцитов, тогда как низкий уровень лактата в ткани тестикул после моделирования клинической смерти сопровождается гибелью значительной части герминативных клеток.

При исследовании интенсивности свободнорадикальных процессов через 24 часа после моделирования терминальных состояний была установлена дальнейшая интенсификация процессов окисления в ткани семенников (рис. 1). При этом процессы перекисного окисления липидов после моделирования клинической смерти протекали более активно, чем после острой гипобарической гипоксии (табл. 3). Так, через 24 часа после пережатия сердечно-сосудистого пучка концентрация триеновых конъюгатов была на 92% выше, а оснований Шиффа на 50% выше, чем после моделирования острой гипобарической гипоксии. Параллельно отмечалось увеличение интенсивности окислительной модификации белков (табл. 2).

Учитывая то, что активность свободнорадикального окисления в раннем постреанимационном периоде была достоверно выше после моделирования клинической смерти, чем острой гипобарической гипоксии (рис. 1), можно было ожидать более высокого содержания карбонильных производных окисленных белков в ткани тестикул после ишемического воздействия. Однако в ходе экспериментальной проверки этого предположения статистически значимых различий между показателями ОМБ через 24 часа после моделирования клинической смерти и острой гипобарической гипоксии выявлено не было (табл. 2). Более того, на третьи сутки количество карбонильных производных белков в ткани семенников достоверно не отличалось от группы интактных животных (табл. 2).

Как известно, свободные радикалы атакуют белки по всей длине полипептидной цепи, нарушая не только первичную, но и вторичную, и третичную структуру белков, что приводит к агрегации или фрагментации белковой молекулы [Е.Е. Дубинина, 2003]. Возможно и так называемое металлкатализируемое окисление белков, затрагивающее ту часть белковой молекулы, которая участвует в связывании металлов переменной валентности. К числу таких белков относят ряд ферментов, таких как пируватдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа [Н.П. Чеснокова, 2007].

Признаком инактивации данных ферментов в нашей работе явилось увеличение уровня пирувата в ткани семенника (табл. 4.), что могло свидетельствовать о нарушении его превращения в ацетил-СоА и/или лактат.

Таблица 4

Содержание пирувата (мкмоль/г ткани) в ткани тестикул самцов белых крыс с после моделирования терминальных состояний (M±m)

Сроки наблюдения	Острая гипобарическая гипоксия		Клиническая смерть	
интактные	0,26±0,02			
40 минут	0,37 ± 0,03**	n = 10	0,18 ± 0,02***	n = 7
24 часа	0,46 ± 0,02*	n = 10	0,55 ± 0,05*	n = 7
3 сутки	0,84 ± 0,04*	n = 10	0,92 ± 0,04*	n = 7
7 сутки	1,65 ± 0,08*	n = 10	1,69 ± 0,04*	n = 7
14 сутки	1,49 ± 0,04*	n = 10	1,67 ± 0,05*	n = 7
21 сутки	1,39 ± 0,04*	n = 10	1,53 ± 0,06*	n = 7
30 сутки	1,28 ± 0,03*	n = 10	1,32 ± 0,04*	n = 7
45 сутки	0,22 ± 0,03	n = 10	0,28 ± 0,03	n = 7
60 сутки	0,23 ± 0,03	n = 10	0,19 ± 0,02***	n = 7

Примечание: * - достоверность различий с интактными животными;

* - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,05$

Обнаружена высокая обратная корреляционная зависимость между концентрацией пирувата и количеством клеток сперматогенного эпителия ($r = -0,82 - 0,59$).

Таким образом, дополнительная генерация радикальных продуктов через 24 часа после ишемического и гипоксического воздействия, интенсификация окислительной деструкции белков и липидов приводит к большому нарушению структуры клеточных мембран и последующему уменьшению количества клеток в семенниках (7, 14 сутки наблюдения). Кроме того, в ткани тестикул в результате ингибирования активности ферментов развивается энергодефицит, связанный с нарушением аэробного компонента энергосинтезирующей функции, о чем свидетельствует высокий уровень пирувата в тканях семенников.

Как показали наши эксперименты, начиная с 21 суток после гипоксического и после ишемического воздействия, наблюдалось некоторое увеличение количества герминативных клеток (табл. 1), что, вероятно, связано с началом новой стадии цикла развития клеток сперматогенного эпителия [L.R. França, 1998], а также с увеличением концентрации лактата в ткани тестикул в связи с небольшим нарастанием числа клеток Сертоли.

Необходимо отметить, что на 21 и 30 сутки экспериментов было обнаружено усиление процессов свободнорадикального окисления (рис.1), что, вероятно, обусловлено активизацией клеточного деления в ткани семенников [П.Г. Богач, 1981]. Активность антиоксидантной системы оставалась низкой до конца периода наблюдения (рис. 2), что, по нашему мнению, объясняется пониженным количеством клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига до 60-х суток экспериментов.

Было установлено, что нарушения сперматогенеза, наблюдаемые в постреанимационном периоде, сопровождались количественными и качественными изменениями эякулята.

После моделирования клинической смерти нам не удавалось получить сперму в течение первых 14 суток постреанимационного периода.

Исследование эякулята, проведенное в отдаленном постреанимационном периоде после пережатия сердечно-сосудистого пучка, выявило более низкое количество сперматозоидов в семенной жидкости, чем в этот же период после моделирования острой гипобарической гипоксии (рис. 4).

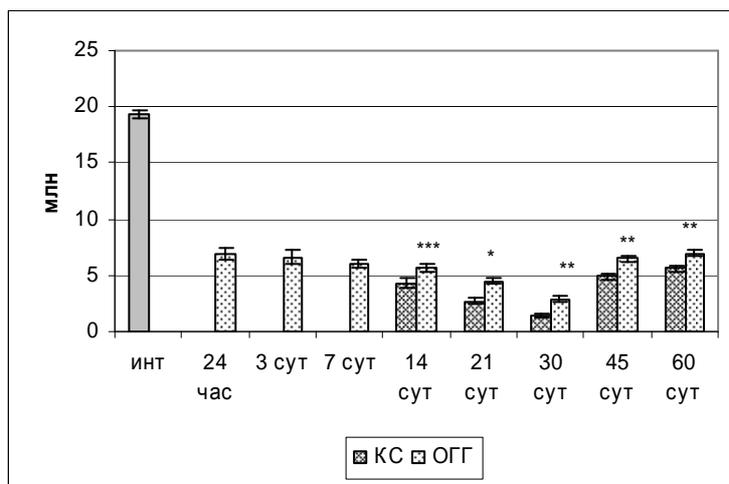


Рис. 4. Количество сперматозоидов в эякуляте самцов белых крыс после моделирования клинической смерти и острой гипобарической гипоксии.
 *- достоверность различий в группах, $p < 0,001$;
 ** - достоверность различий в группах, $p < 0,01$;
 *** - достоверность различий в группах, $p < 0,05$.

После моделирования клинической смерти в эякуляте была обнаружена и более низкая двигательная активность сперматозоидов, чем после моделирования острой гипобарической гипоксии (рис. 5).

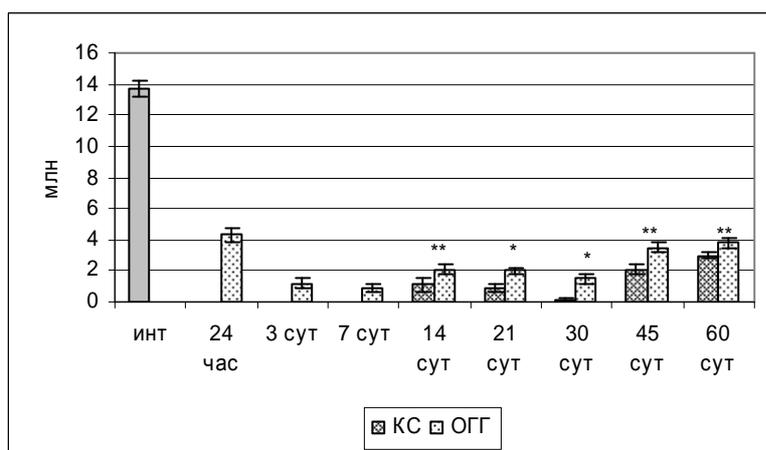


Рис. 5. Количество подвижных сперматозоидов в эякуляте самцов белых крыс после моделирования клинической смерти и острой гипобарической гипоксии.
 * - достоверность различий в группах, $p < 0,01$;
 ** - достоверность различий в группах, $p < 0,05$.

Таким образом, постреанимационный период характеризуется достоверным снижением количества сперматозоидов в эякуляте. Одновременно происходит снижение подвижности клеток. Эти изменения, по

данным ряда исследователей, могут существенно ограничивать фертильность гамет, что неоднократно доказано при изучении процессов оплодотворения *in vitro* [С.Б. Артифексов, 2008]. При этом наиболее значимые количественные и качественные изменения эякулята наблюдаются после моделирования клинической смерти, чем после острой гипобарической гипоксии.

Сравнительный анализ состояния сперматогенеза при введении препаратов после перенесенных терминальных состояний

Положительный эффект от применения препаратов был получен при раннем однократном введении актовегина в дозе 10 мг/кг или мексидола в дозе 50 мг/кг сразу после успешных реанимационных мероприятий. При этом были выявлены существенные отличия в выраженности эффектов действия актовегина и мексидола на сперматогенез (табл.5).

Полученные нами результаты показали, что на фоне введения мексидола, в раннем постреанимационном периоде (первые трое суток) после моделирования острой гипобарической гипоксии наблюдалось существенное снижение количества клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига по сравнению с группой животных с острой гипобарической гипоксией. После моделирования клинической смерти в группе животных с мексидолом количество всех типов клеток было несколько выше, чем в группе животных с клинической смертью. К концу периода наблюдения после ишемического и гипоксического воздействия отмечалось восстановление количества сперматогоний и клеток Сертоли, что может являться благоприятным условием для последующего восстановления сперматогенеза.

При цитологическом исследовании ткани семенников после применения актовегина установлено, что в раннем постреанимационном периоде наблюдается более высокое содержание клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига, чем в группе животных без препарата. Высокая сохранность клеточного состава тестикул способствовала полному восстановлению сперматогенеза на 21 сутки наблюдения после моделирования острой гипобарической гипоксии и на 45 сутки после моделирования клинической смерти.

Было проведено сравнительное изучение влияния мексидола и актовегина на процессы свободнорадикального окисления (СРО). В раннем постреанимационном периоде нами были обнаружены достоверные различия в действии препаратов на уровень свободнорадикального окисления (рис. 6, рис. 7). Мексидол оказался более эффективен в отношении общей свободнорадикальной активности (I_{max}), чем актовегин. Введение мексидола способствовало нормализации показателя светосуммы I_{max} на 40 минуте постгипоксического периода (рис. 6), а в постишемическом – этот показатель был в 1,2 раза ниже, чем в группе животных с актовегином ($p < 0,001$) (рис. 7).

Таблица 5

Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия, клеток Сертоли и Лейдига в ткани тестикул самцов белых крыс при введении актовегина и мексидола после моделирования терминальных состояний (M±m)

Виды клеток	Сроки наблюдения	ОГГ	ОГГ+А	ОГГ+М	КС	КС+А	КС+М
Сперматогонии (млн/г ткани)	Интактные	27,8 ± 1,1					
	24 часа	25,8 ± 1,3	26,5 ± 1,0	2,6 ± 0,3* [▲]	1,8 ± 0,1	19,8±1,1* [▲]	3,0 ± 0,2** [▲]
	3 сутки	2,3 ± 0,1	18,6 ± 0,9* [▲]	1,1 ± 0,1* [▲]	1,7 ± 0,4	7,6 ± 0,5* [▲]	2,1 ± 0,1*** [▲]
	21 сутки	2,1 ± 0,1	27,0 ± 1,0*	12,6 ± 0,8* [▲]	1,3 ± 0,1	20,2±2,2* ^{▲▲}	18,4 ± 1,2* [▲]
	45 сутки	4,2 ± 0,2	27,8 ± 2,0*	28,5 ± 1,8*	2,1 ± 0,2	30,7 ± 2,2*	27,9 ± 2,1*
	60 сутки	5,2 ± 0,2	29,1 ± 1,4*	26,0 ± 1,3*	3,3 ± 0,2	27,5 ± 1,8*	25,9 ± 2,9*
Сперматогонии (млн/г ткани)	Интактные	132,2 ± 7,5					
	24 часа	260,7±10,0	161,1±5,7* ^{▲▲}	27,2±1,1* [▲]	4,1 ± 0,4	100,4±5,6* ^{▲▲}	6,9±0,3** [▲]
	3 сутки	8,9±0,4	86,5±4,3* [▲]	26,5±2,3* [▲]	3,8 ± 0,5	54,4 ± 2,3* [▲]	5,4 ± 0,3*** [▲]
	21 сутки	7,5±0,5	129,8±5,2*	45,4±2,3* [▲]	5,8 ± 0,3	96,5 ± 7,9* ^{▲▲}	46,4±2,5* [▲]
	45 сутки	19,5±1,6	135,2±7,8*	106,5±4,5* ^{▲▲▲}	6,9 ± 0,6	133,1 ± 3,6*	88,1±4,3* [▲]
	60 сутки	23,0±1,3	128,8±8,5*	102,3±4,6* ^{▲▲}	12,2±0,7	131,4 ± 2,6*	98,0±10,6* ^{▲▲▲}
Сперматиды ранние (млн/г ткани)	Интактные	142,3 ± 6,2					
	24 часа	51,2±1,9	121,1±4,2* ^{▲▲▲}	16,1±1,0* [▲]	1,4±0,3	98,3±4,0* [▲]	3,3±0,3** [▲]
	3 сутки	1,1±0,1	71,8±2,9* [▲]	5,3±0,5* [▲]	0,8±0,2	28,4±1,7* [▲]	2,1 ± 0,2** [▲]
	21 сутки	2,3±0,2	137,1±5,2*	30,1±1,8* [▲]	1,5±0,1	92,7±6,8* [▲]	33,6 ± 3,5* [▲]
	45 сутки	9,2±0,7	140,8±7,2*	111,6±4,8* ^{▲▲}	3,0±0,2	141,2±3,2*	90,7 ± 3,4* [▲]
	60 сутки	13,5±0,5	139,3±7,8*	111,3±4,1* ^{▲▲}	8,0±0,5*	135,4±3,7*	96,0 ± 10,9* ^{▲▲}
Сперматиды поздние (млн/г ткани)	Интактные	147,9±5,5					
	24 часа	73,7±1,9	99,1±4,7* [▲]	12,4±1,3* [▲]	3,2±0,4	90,4±3,3* [▲]	16,8 ± 0,5* [▲]
	3 сутки	5,4±0,2	60,8±3,5* [▲]	3,0±0,3* [▲]	2,6±0,3	19,1±1,5* [▲]	8,0 ± 0,3* [▲]
	21 сутки	4,1 ± 0,3	141,0±4,9*	36,5±2,0* [▲]	2,7±0,2	93,6±7,5* [▲]	37,2 ± 3,7* [▲]
	45 сутки	18,9±1,1	149,2±7,9*	113,0±6,9* ^{▲▲}	7,8±0,3	144,5±3,4*	95,5 ± 4,4* [▲]
	60 сутки	23,2±0,7	143,4±8,0*	115,2±3,2* [▲]	12,9±0,7	141,1±2,8*	94,8 ± 11,1* ^{▲▲}
Сперматозоиды (млн/г ткани)	Интактные	81,0 ± 1,6					
	24 часа	78,5±1,8	78,5±1,8	80,5±1,4	19,3±1,7	72,1±1,0* ^{▲▲}	27,9 ± 1,5** [▲]
	3 сутки	32,0±1,7	53,5±1,3* [▲]	32,0±1,7 [▲]	13,6±1,4	52,9±1,0* [▲]	22,9 ± 1,0** [▲]
	21 сутки	30,5±1,2	80,5±1,4*	57,0±1,9* [▲]	25,0±2,2	61,4±1,4* [▲]	32,1 ± 1,5*** [▲]
	45 сутки	33,0±1,1	80,5±1,2*	63,5±2,4* [▲]	30,0±2,2	80,7±1,3*	52,1 ± 1,5* [▲]
	60 сутки	39,0±1,2	82,0±1,9*	66,0±2,3* [▲]	32,9±2,1	81,4±1,4*	61,4 ± 1,4* [▲]
Клетки Сертоли (млн/г ткани)	Интактные	42,4 ± 1,8					
	24 часа	41,3 ± 2,3	39,0 ± 1,9	10,8±0,5* [▲]	3,7 ± 0,5	30,8±1,4* [▲]	7,4±0,5** [▲]
	3 сутки	6,1 ± 0,2	31,8 ± 1,6* [▲]	4,7 ± 0,3** [▲]	3,6 ± 0,6	12,4 ± 0,6* [▲]	5,9 ± 0,2*** [▲]
	7 сутки	3,4 ± 0,2	31,7 ± 1,6* [▲]	10,7 ± 0,5* [▲]	2,9 ± 0,1	10,8 ± 0,8* [▲]	4,5±0,4** [▲]
	21 сутки	4,3 ± 0,3	42,7 ± 1,5*	22,1±1,6* [▲]	2,7 ± 0,2	32,1±2,6* [▲]	32,3±1,7* ^{▲▲}
	45 сутки	8,1 ± 0,5	47,2 ± 3,1*	37,0 ± 2,6*	4,1±0,2*	39,8±2,3*	41,8±2,5*
Клетки Лейдига (млн/г ткани)	Интактные	8,1 ± 0,9					
	24 часа	8,0 ± 0,8	7,4 ± 0,8	1,9 ± 0,2* [▲]	0,4 ± 0,1	4,8±0,8* ^{▲▲}	0,8±0,1*** [▲]
	3 сутки	0,6 ± 0,1	3,7 ± 0,5* [▲]	0,9 ± 0,1** [▲]	0,3±0,05	2,3 ± 0,3* [▲]	0,5 ± 0,1*** [▲]
	21 сутки	0,3 ± 0,1	7,4 ± 1,0*	2,7 ± 0,3* [▲]	0	2,7±0,7*** [▲]	1,4±0,4*** [▲]
	45 сутки	1,0 ± 0,2	7,8 ± 1,2*	5,8 ± 0,5* ^{▲▲▲}	0,1 ± 0,1	8,4±1,3*	3,4±0,6** [▲]
	60 сутки	1,4 ± 0,1	7,4 ± 0,9*	5,5 ± 0,6* ^{▲▲}	0,4 ± 0,1	7,2±0,9*	3,4±0,6*** [▲]

Примечание: [▲] - достоверность различий с интактными животными; p < 0,001; ^{▲▲} – p < 0,01; ^{▲▲▲} – p < 0,05;

* - достоверность различий в группах (модель+препарат); p < 0,001; ** – p < 0,01; *** – p < 0,05

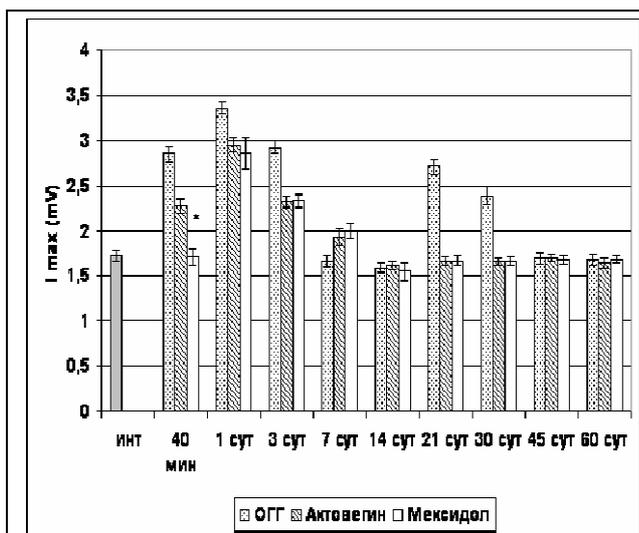


Рис. 6. Интенсивность свободно-радикального окисления в ткани тестикул самцов белых крыс после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.
* - достоверность различий в группах (ОГГ+М и ОГГ+А); $p < 0,001$

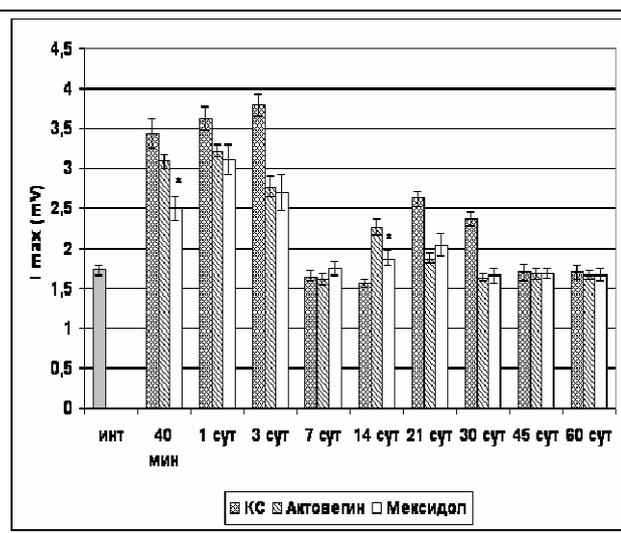


Рис.7. Интенсивность свободно-радикального окисления в ткани тестикул самцов белых крыс после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.
* - достоверность различий в группах (КС+М и КС+А); $p < 0,001$

Результаты изучения перекисных процессов свидетельствовали о том, что актовегин и мексидол на 40 минуте постреанимационного периода предотвращали чрезмерную активацию процессов липопероксидации (рис. 8 и 9). При этом, в ткани тестикул актовегин оказывал более выраженное по сравнению с мексидолом ингибирующее влияние на процессы ПОЛ, вызывая достоверное уменьшение содержания конечных (ОШ) продуктов ПОЛ ($p < 0,05$).

Результаты нашей работы показали, что использованные медикаментозные препараты ингибируют не только ПОЛ, но и процессы окислительной модификации белков (ОМБ), причем эффективность применения актовегина оказалась более высокой. Так, на 40 минуте постгипоксического периода на фоне применения мексидола обнаружено снижение показателей ОМБ до уровня интактных животных, в то время как актовегин снижал перекисную деструкцию белков достоверно ниже уровня интактных животных ($p < 0,05$) (рис. 10).

В постишемическом периоде действие препаратов имело ту же направленность, но эффект от их применения был менее выражен. Так, под влиянием мексидола наблюдалось заметное снижение количества карбонильных производных окисленных белков по отношению к группе животных без препарата. В отличие от этого, актовегин снижал содержание альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера до уровня интактных животных (рис. 11).

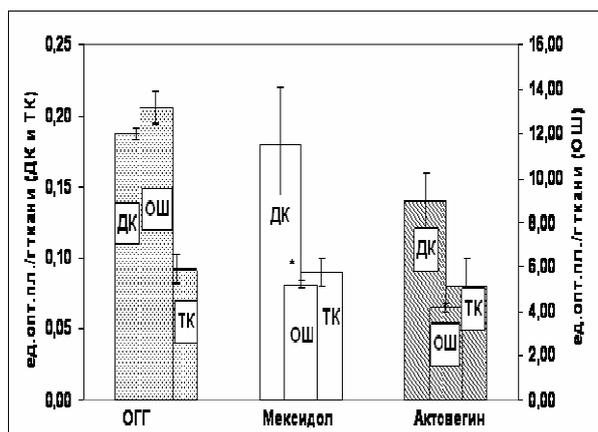


Рис.8. Количество продуктов перекисного окисления липидов в ткани семенников через 40 минут после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.

* - достоверность различий в группах (OGG+M и OGG+A); $p < 0,05$.

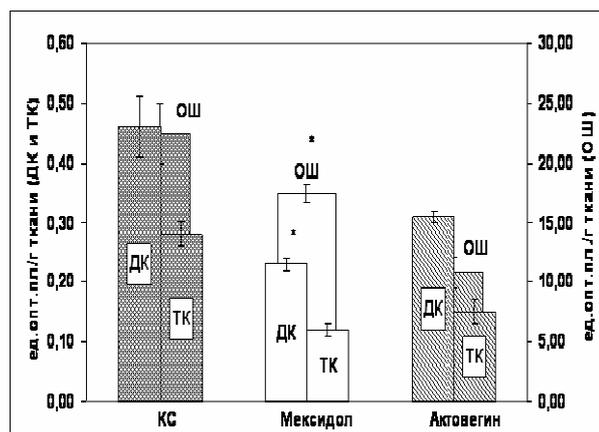


Рис. 9. Количество продуктов перекисного окисления липидов в ткани семенников через 40 минут после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.

* - достоверность различий в группах (KS+M и KS+A); $p < 0,05$.

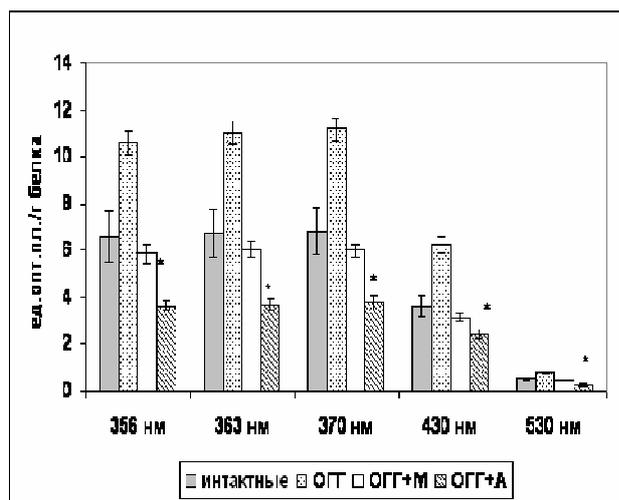


Рис. 10. Количество карбонильных производных ОМБ в ткани тестикул на 40 минуте после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.

* - достоверность различий в группах (OGG+M и OGG+A); $p < 0,05$.

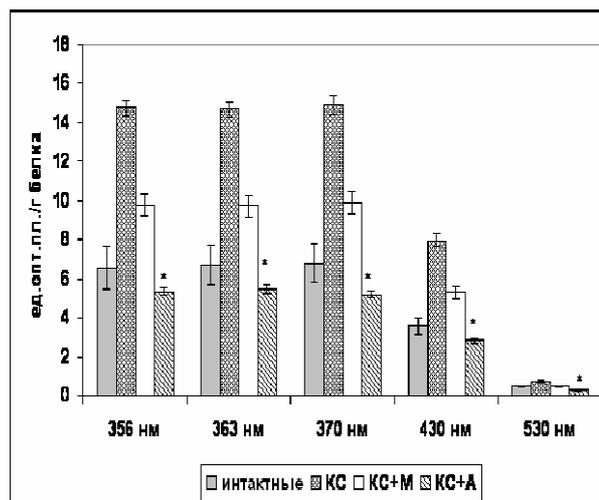


Рис. 11. Количество карбонильных производных ОМБ в ткани тестикул на 40 минуте после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.

* - достоверность различий в группах (KS+M и KS+A); $p < 0,05$.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что мексидол, на 40 минуте постреанимационного периода в большей степени снижал содержание активных форм кислорода и свободных радикалов в ткани тестикул и менее эффективно – продуктов окислительной модификации белков и содержание липидных гидроперекисей. Актовегин в ткани тестикул оказывал выраженное ингибирующее влияние на ПОЛ, заметно снижая уровень ОШ, и вызывал при этом подавление процесса ОМБ.

Через 24 часа после реанимации сохранялась отмеченная активация ПОЛ и ОМБ, но под действием препаратов она в значительной степени была скорректирована (рис.12, рис. 13).

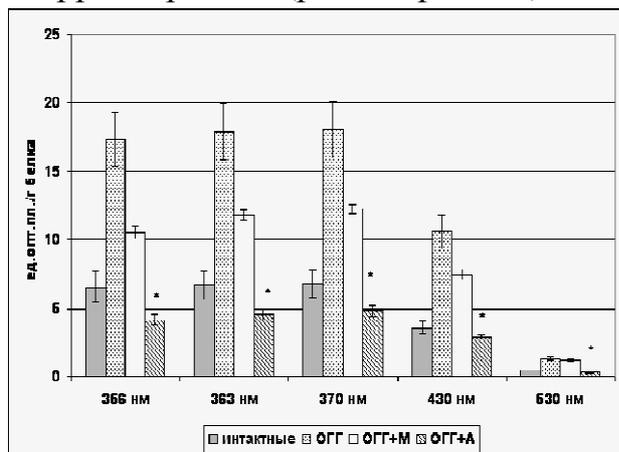


Рис. 12. Количество карбонильных производных ОМБ в ткани тестикул через 24 часа после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.
* - достоверность различий в группах (ОГГ+М и ОГГ+А); $p < 0,05$.

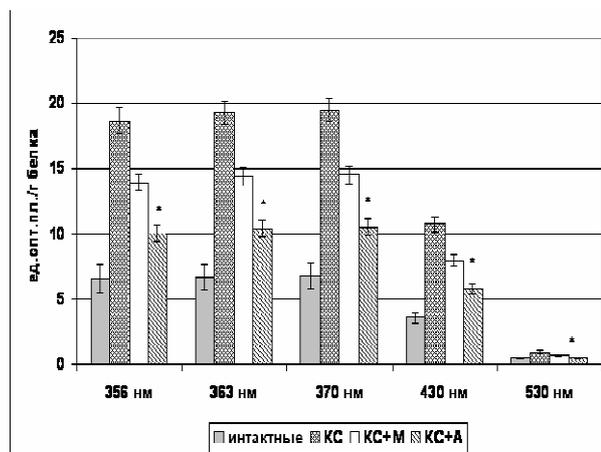


Рис. 13. Количество карбонильных производных ОМБ в ткани тестикул через 24 часа после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.
* - достоверность различий в группах (КС+М и КС+А); $p < 0,05$.

При этом необходимо отметить, что при оценке содержания продуктов ОМБ в группах животных с мексидолом и актовегином сохранялись статистически значимые отличия. Актовегин в большей степени снижал концентрацию карбонильных производных, чем мексидол

В тоже время статистически значимых различий в содержании продуктов ПОЛ выявлено не было (рис. 14. и 15).

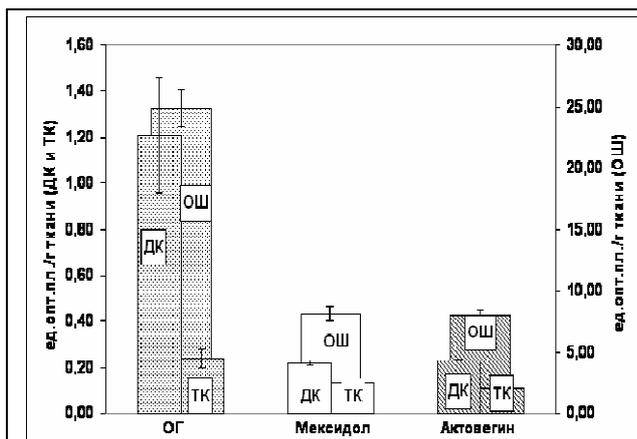


Рис. 14. Количество продуктов ПОЛ в ткани семенников через 24 часа после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.
- достоверность различий в группах (ОГГ+М и ОГГ+А); $p > 0,05$.

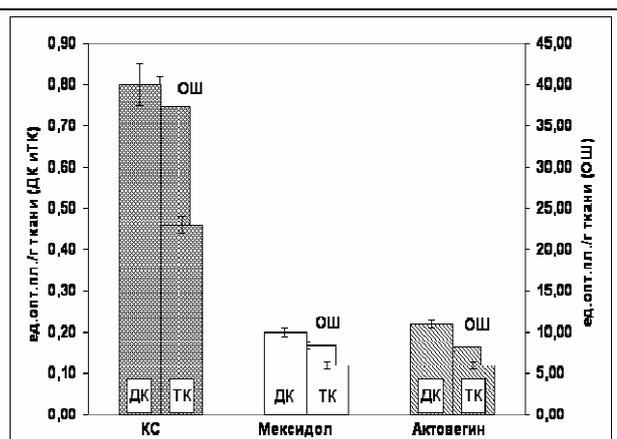


Рис. 15. Количество продуктов ПОЛ в ткани семенников через 24 часа после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.
- достоверность различий в группах (КС+М и КС+А); $p > 0,05$.

На третьи сутки постреанимационного периода статистически значимых различий в количестве продуктов ПОЛ И ОМБ в группах животных с актовегином и мексидолом выявлено не было.

Таким образом, каждый из использованных препаратов в раннем постреанимационном периоде уменьшал чрезмерную активацию процессов свободнорадикального окисления в ткани семенников. При этом актовегин продемонстрировал более выраженное действие на процесс окислительной модификации белков, чем мексидол.

При исследованиях содержания лактата было установлено, что на 40 минуте постреанимационного периода после моделирования острой гипобарической гипоксии на фоне применения мексидола снижалась концентрация лактата в ткани семенников в отличие от группы животных без препарата. Концентрация лактата в ткани семенников была достоверно ниже, чем у интактных животных. Применение актовегина на ранних сроках постгипоксического периода не влияло на концентрацию лактата (рис. 16)

На 40 минуте постреанимационного периода после моделирования клинической смерти, оба препарата сглаживают падение концентрации лактата, вызываемое периодом ишемии. Причем эффект актовегина был выражен в большей степени, чем мексидола (рис. 17).

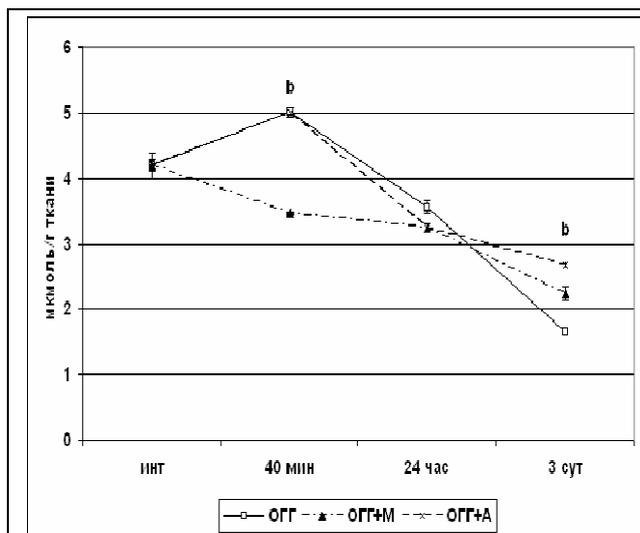


Рис.16. Содержание лактата в ткани тестикул самцов белых крыс после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов. b - достоверность различий в группах (ОГГ+М и ОГГ+А); $p < 0,001$

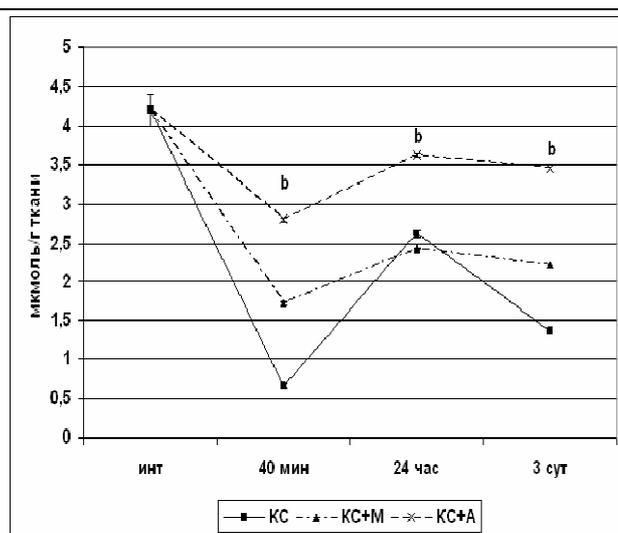


Рис. 17. Содержание лактата в ткани тестикул самцов белых крыс после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов. b - достоверность различий в группах (КС+М и КС+А); $p < 0,001$

Полученные данные позволили нам предположить, что актовегин, улучшая транспорт и утилизацию глюкозы клетками [А.К. Гулевский, 2008], а значит и клетками Сертоли, увеличивает синтез лактата в них. Известно, что способность герминативных клеток использовать глюкозу очень ограничена.

Только достаточная концентрация лактата, основного энергетического субстрата [К. Erkkila, 2006], обеспечивает их выживаемость.

Использование мексидола сопровождалось выраженным снижением уровня лактата в ткани тестикул, что, в конечном итоге, приводило к уменьшению количества клеток сперматогенного эпителия в раннем постреанимационном. Однако раннее введение мексидола сопровождалось значительным снижением окислительной деструкции липидов, белков и, по-видимому, других атакуемых активными формами кислорода молекул (например, нуклеиновых кислот) [Л.Е. Муравлева, 2010], обеспечивая структурную сохранность оставшихся клеток, что, в дальнейшем, способствовало ускорению, по сравнению с серией животных без применения препарата, начала восстановительных процессов.

При исследовании эякулята обратило на себя внимание то, что в раннем постгипоксическом периоде количество сперматозоидов, а также их подвижность в семенной жидкости в группе животных с введением актовегина были выше, чем в группе с введением мексидола (рис. 18, рис. 19).

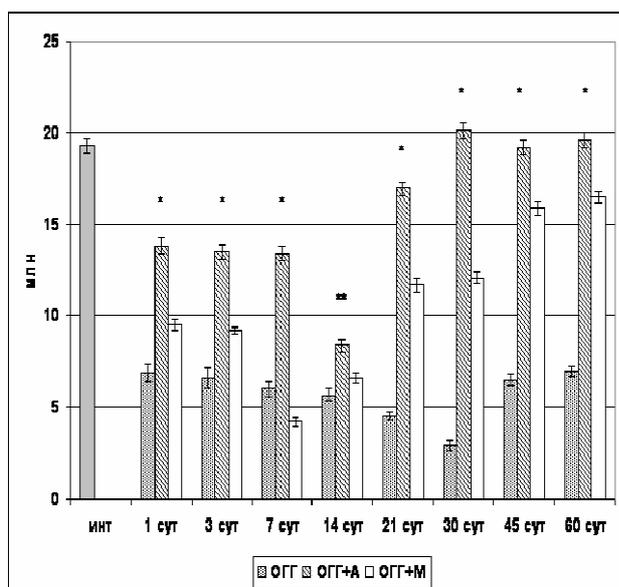


Рис. 18. Количество сперматозоидов в эякуляте самцов белых крыс после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.

* - достоверность различий в группах (OGG+M и OGG+A); $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$.

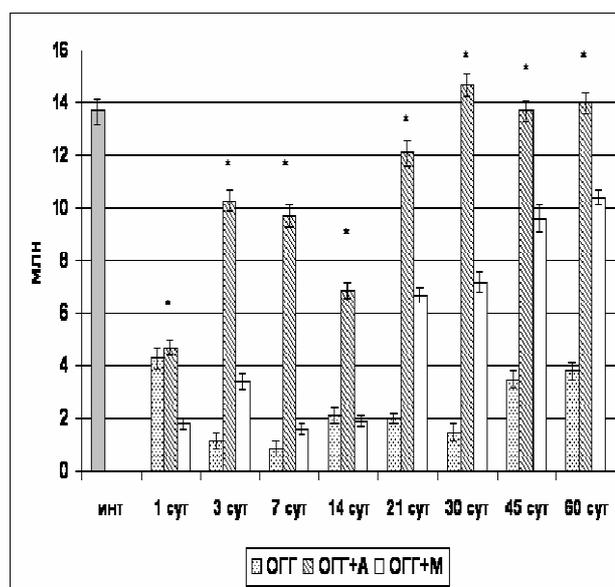


Рис. 19. Количество подвижных сперматозоидов в эякуляте самцов белых крыс после моделирования острой гипобарической гипоксии без применения препаратов и после введения препаратов.

* - достоверность различий в группах (OGG+M и OGG+A); $p < 0,001$.

Как было указано выше, в группе животных с актовегином процесс сперматогенеза полностью восстанавливался к 21 суткам постгипоксического периода, тогда как количественные и качественные характеристики эякулята нормализовались лишь на 30 сутки эксперимента. Это связано с тем, что

сперматозоиды для приобретения подвижности и оплодотворяющей способности дозревают в придатке семенника около 2 недель.

В группе животных с использованием мексидола процесс сперматогенеза не восстанавливался к концу срока наблюдения, и все показатели эякулята были снижены.

Важно отметить, что после моделирования острой гипобарической гипоксии в группе животных без применения препаратов показатели спермограммы были достоверно ниже, чем в группе животных с введением мексидола.

Попытки получения эякулята после моделирования клинической смерти в группах животных с введением актовегина и мексидола, так же, как и в группе животных без применения препаратов, были неэффективны до 14 суток эксперимента.

Как показали наши исследования, количество сперматозоидов в эякуляте и их подвижность в отдаленном постреанимационном периоде были значительно выше после применения актовегина, чем мексидола (рис. 20, рис. 21).

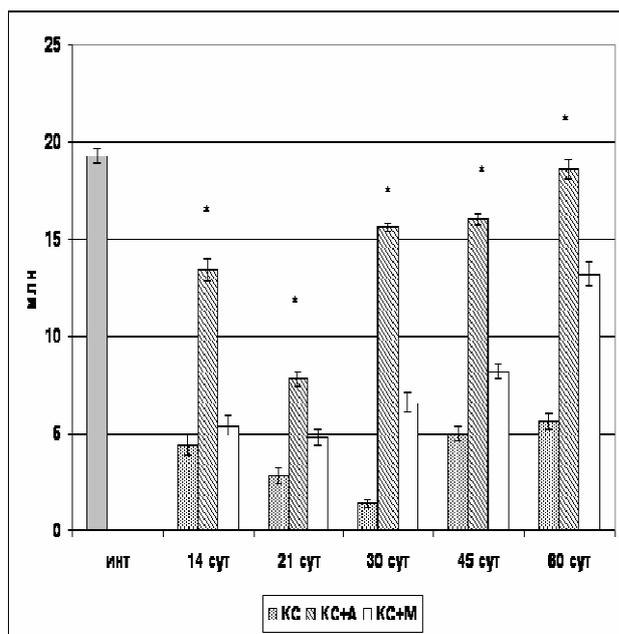


Рис. 20. Количество сперматозоидов в эякуляте самцов белых крыс после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.
* - достоверность различий в группах (KC+M и KC+A); $p < 0,001$.

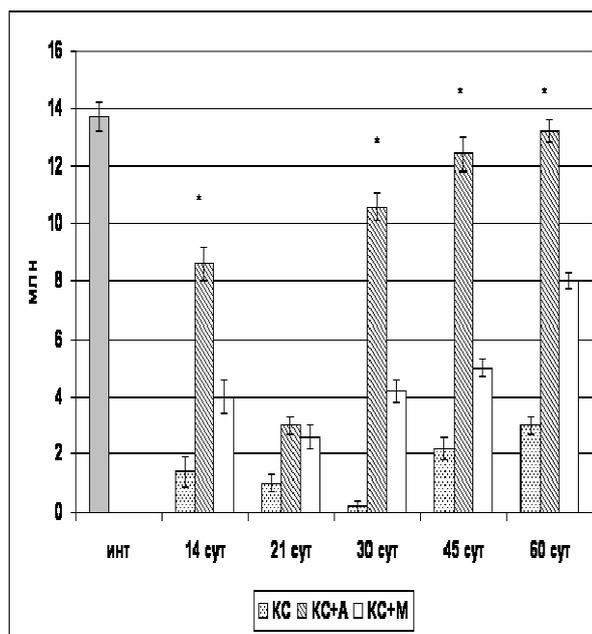


Рис. 21. Количество подвижных сперматозоидов в эякуляте самцов белых крыс после моделирования клинической смерти без применения препаратов и после введения препаратов.
* - достоверность различий в группах (KC+M и KC+A); $p < 0,001$.

Показатели спермограммы в группе животных с актовегином восстановились к 60 суткам наблюдения. В группе животных с введением

мексидола общее количество сперматозоидов и их подвижность были достоверно выше, чем у животных без применения препаратов. Однако, к концу срока эксперимента, полного восстановления показателей спермограмм не наблюдалось.

Таким образом, проведенные нами исследования показали реальную возможность коррекции нарушений сперматогенеза, возникающих как во время умирания, так и в течение постреанимационного периода. Причем, при патологических состояниях, для которых нарушения метаболизма выступают как главный патогенетический механизм, раннее применение актовегина и мексидола может стать основой лечения.

Нами было доказано, что отсроченное введение препаратов не приводит к восстановлению сперматогенеза. Мы провели серию опытов, в которой актовегин в дозе 10 мг/кг и мексидол в дозе 50 мг/кг вводили через сутки после реанимации. Начиная с 7-х суток постреанимационного периода, был проведен сравнительный цитологический анализ. Результаты показали, что применение актовегина и мексидола не оказывало положительного влияния на количественный состав клеток тестикул (табл. 6).

Таблица 6

Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия, клеток Сертоли и клеток Лейдига в ткани семенника самцов белых крыс после моделирования острой гипобарической гипоксии и введения актовегина через сутки ($M \pm m$)

Виды клеток	Сроки наблюдения	ОГГ	Кол. жив.	ОГГ + М	Кол. жив.	ОГГ + А	Кол. жив.
Сперматогонии	7 сутки	1,2 ± 0,1	n = 10	1,2 ± 0,1	n = 5	1,4 ± 0,2	n = 5
	60 сутки	5,2 ± 0,2	n = 10	4,8 ± 0,6	n = 5	4,8 ± 0,3	n = 5
Сперматоциты	7 сутки	4,6 ± 0,3	n = 10	4,6 ± 0,3	n = 5	5,1 ± 0,3	n = 5
	60 сутки	23,0 ± 1,3	n = 10	27,6 ± 3,1	n = 5	26,4 ± 1,5	n = 5
Сперматиды ранние	7 сутки	0,4 ± 0,05	n = 10	0,5 ± 0,1	n = 5	0,5 ± 0,1	n = 5
	60 сутки	13,5 ± 0,5	n = 10	11,1 ± 0,9	n = 5	12,1 ± 0,3	n = 5
Сперматиды поздние	7 сутки	2,8 ± 0,1	n = 10	2,4 ± 0,1	n = 5	2,8 ± 0,1	n = 5
	60 сутки	23,2 ± 0,7	n = 10	24,6 ± 2,6	n = 5	24,7 ± 1,2	n = 5
Сперматозоиды	7 сутки	21,0 ± 1,2	n = 10	20,6 ± 0,8	n = 5	21,6 ± 0,9	n = 5
	60 сутки	39,0 ± 1,2	n = 10	41,4 ± 1,0	n = 5	41,4 ± 1,0	n = 5
Клетки Сертоли	7 сутки	3,4 ± 0,2	n = 10	3,2 ± 0,1	n = 5	3,7 ± 0,2	n = 5
	60 сутки	9,7 ± 0,4	n = 10	9,8 ± 1,1	n = 5	10,0 ± 0,6	n = 5
Клетки Лейдига	7 сутки	0,3 ± 0,06	n = 10	0,2 ± 0,1	n = 5	0,3 ± 0,01	n = 5
	60 сутки	1,4 ± 0,1	n = 10	1,4 ± 0,1	n = 5	1,7 ± 0,3	n = 5

Примечание: достоверность различий ОГГ с ООГ + А и ОГГ + М; $p > 0,05$

Поскольку в группах животных с введением препаратов и в группе животных без препарата достоверных различий в спермограмме не наблюдалось, можно вполне аргументировано высказать мнение о нецелесообразности использования актовегина и мексидола с целью коррекции сперматогенеза через сутки после реанимации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами экспериментальные данные показали, что после моделирования терминальных состояний у экспериментальных животных возникают существенные нарушения сперматогенеза. При этом более значительные изменения были обнаружены после моделирования терминального состояния путем пережатия сердечно-сосудистого пучка, чем после острой гипобарической гипоксии.

Существующие различия в клеточном составе семенников в раннем постреанимационном периоде, связаны как с моделями терминальных состояний (гипоксии или ишемии), так и с особенностями энергетического метаболизма клеток тестикул (сперматоциты и сперматиды в качестве энергетического субстрата используют лактат, секретируемый клетками Сертоли).

На модели терминального состояния, вызванного острой гипобарической гипоксией, которая характеризуется снижением доставки кислорода в органы и ткани, но сохранением притока субстратов окисления отмечается быстрое нарастание содержания лактата за счет повышения скорости гликолиза в клетках Сертоли, что было зафиксировано нами на 40 минуте постгипоксического периода. Высокая концентрация лактата в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде носила адаптивный характер, обеспечивая относительную стабильность клеточного состава семенников и даже активацию процессов деления через 24 часа постгипоксического периода. Наиболее уязвимыми в этих условиях оказались только сперматиды, поскольку они являются самыми аэробными клетками сперматогенного эпителия [J. G. Farias, 2005].

Иная картина наблюдалась при моделировании клинической смерти. Известно, что в условиях ишемии при клинической смерти прекращается доставка в орган не только кислорода, но и субстратов метаболизма. В результате прекращения кровообращения, а, следовательно, и поступления глюкозы в ткань тестикул, происходит снижение выработки лактата клетками Сертоли. Как известно, клетки сперматогенного эпителия, в условиях низкой концентрации лактата, подвергаются дегенерации через апоптоз, механизм которого находится под контролем тестостерона [K. Erkkilä, 2002].

Гипоксия как пусковой патогенетический фактор, возникающая во время терминального состояния, вызывает в ткани семенников нарушение не только энергетического метаболизма, но и сопряженного с ним процесса образования активных форм кислорода. Образующиеся в клетке радикалы инициируют вторичные свободнорадикальные реакции, вступая во взаимодействие с различными клеточными компонентами: белками, липидами, и нуклеиновыми кислотами, о чем свидетельствует увеличение на 40 минуте после оживления содержания в ткани семенников первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов и увеличение количества модифицированных белков основного и нейтрального характера.

Таким образом, общим звеном патогенетической цепи ранних постреанимационных повреждений клеточного состава семенников становится формирование окислительного стресса, в результате активации свободнорадикальных процессов. Степень выраженности окислительного стресса зависит от вида терминального состояния. Пережатие сердечно-сосудистого пучка приводит к тотальной ишемии, а последующая реанимация сопровождается рециркуляцией и реоксигенацией, развитием «кислородного парадокса», связанного с неспособностью клетки утилизировать поступающий кислород. В этих условиях окислительная модификация липидных и белковых компонентов клеточной мембраны выше, чем после гипоксического воздействия.

Начиная с 3-х суток после моделирования острой гипобарической гипоксии и с 1-х суток после моделирования клинической смерти, уменьшение количества клеток Сертоли и Лейдига, которые оказывают регулирующее влияние на сперматогенез, явилось дополнительным фактором гибели клеток сперматогенного эпителия.

На 21 сутки наблюдения, наметилась тенденция к активации сперматогенеза, что связано с началом новой стадии цикла развития клеток сперматогенного эпителия. Важно подчеркнуть, что и к 60 суткам эксперимента количество клеток сперматогенного эпителия оставалось достоверно ниже уровня интактных животных.

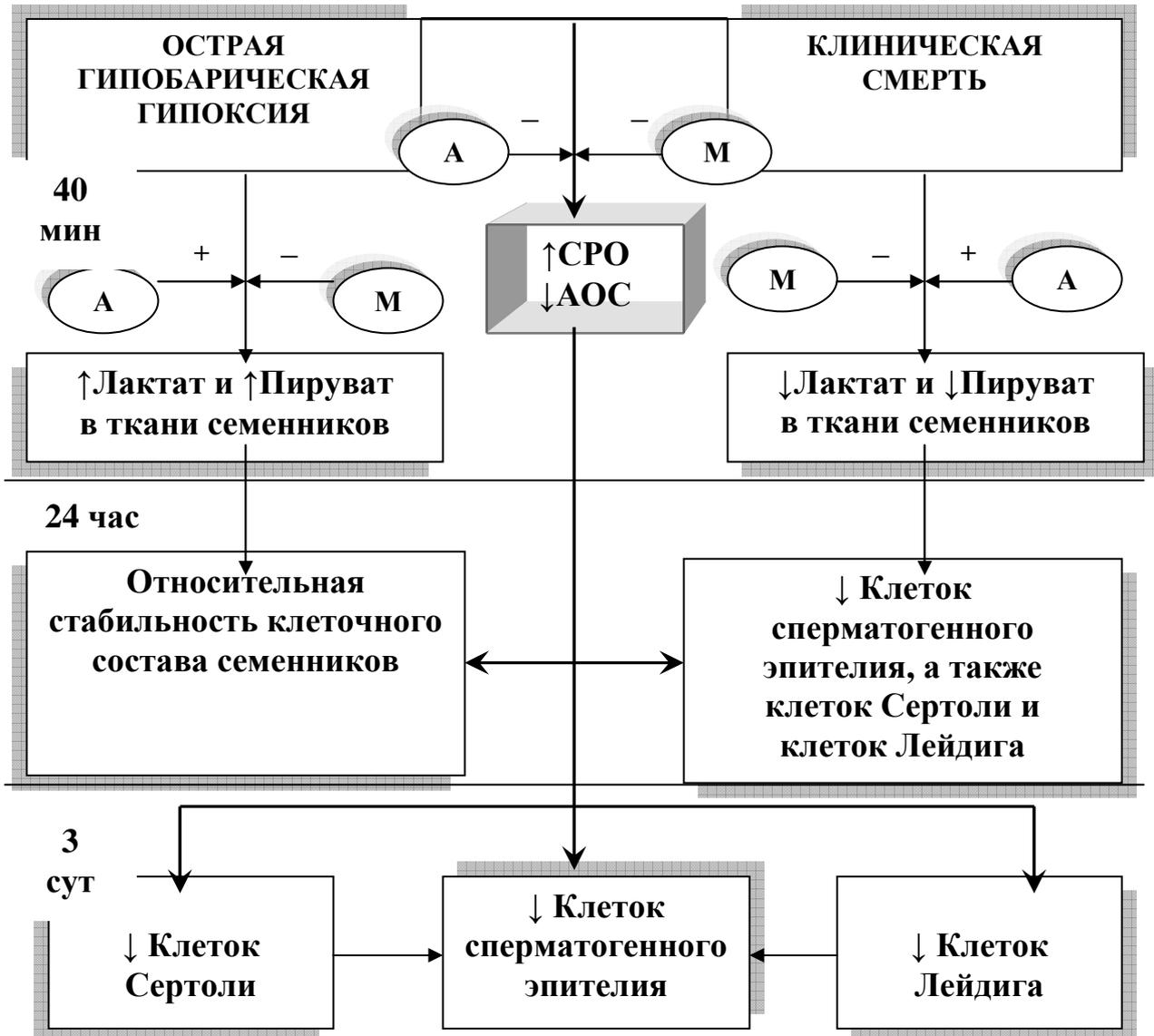
Поскольку главными причинами негативных последствий в ткани семенников во время умирания и в первые часы после оживления является нарушение энергообразующих процессов, образование, при неполном восстановлении кислорода, высокореакционных свободных радикалов и снижение антиоксидантной защиты, то в этих условиях перспективным направлением коррекции постреанимационных изменений является применение метаболических препаратов с комплексными антигипоксическими и антиоксидантными свойствами. К таким препаратам относятся актовегин и мексидол. Метаболические препараты обладают принципиальной особенностью, пренебрежение которой может привести к потере их клинической эффективности: от их раннего введения зависит выраженность эффекта. Нами показано, что терапевтический эффект этих препаратов, введенных через сутки после моделирования терминальных состояний, отсутствует. Положительный эффект был получен при раннем однократном введении актовегина или мексидола сразу после успешных реанимационных мероприятий. Так, введение мексидола и актовегина приводит к значительному снижению окислительной деструкции липидов, белков, обеспечивая, в дальнейшем, ускорение, по сравнению с серией животных без применения препарата, начала восстановительных процессов сперматогенеза и повышение уровня восстановления. Несмотря на то, что свободно-радикальные процессы и структурно-функциональные изменения свойств биомембран, являющиеся базисными механизмами реанимационной и постреанимационной патологии, требуют ранней коррекции, при этом

защита клеток сперматогенного эпителия должна включать не только подавление свободнорадикального окисления, но и предусматривать возможность поддержания процессов гликолиза в клетках Сертоли, которые синтезируют лактат для обеспечения энергетического статуса герминативных клеток и их выживаемости. Применение в этих случаях актовегина оказалось перспективным. Специфичность метаболического ответа на раннее введение актовегина проявилась в сохранении высокой концентрации лактата в ткани семенников. Актовегин, улучшая транспорт и утилизацию глюкозы клетками [А.К. Гулевский, 2008], увеличивает синтез лактата в клетках Сертоли. Это предохраняет клетки сперматогенного эпителия от их повреждения и гибели в условиях окислительного стресса в раннем постреанимационном периоде. Мексидол, является солью янтарной кислоты. Сукцинат способен окисляться непосредственно в митохондриях, купируя тем самым развитие метаболического ацидоза в тканях при недостатке кислорода, что оказывает благоприятное действие на многие клетки организма. Однако для ткани семенников использование мексидола имеет отрицательный эффект, поскольку снижается выработка клетками Сертоли лактата, необходимого для энергообеспечения герминативных клеток. Итогом раннего однократного применения актовегина явилось полное восстановление сперматогенеза к 21 суткам наблюдения после моделирования острой гипобарической гипоксии и на 45 сутки после моделирования клинической смерти. При введении мексидола к концу периода наблюдения после ишемического и гипоксического воздействия отмечалось восстановление количества сперматогоний и клеток Сертоли, что может являться благоприятным условием для хода последующего цикла сперматогенеза.

В постгипоксическом и постишемическом периодах актовегин оказывал и более выраженный положительный эффект на количественные и качественные показатели эякулята, чем мексидол. Количество сперматозоидов, а также их подвижность в семенной жидкости в группе животных с введением актовегина были выше, чем в группе с применением мексидола во все сроки наблюдения. В группах животных с введением актовегина показатели спермограммы восстанавливались на 30 сутки после моделирования острой гипобарической гипоксии и к 60 суткам после моделирования клинической смерти.

Ниже приведена разработанная нами схема, иллюстрирующая механизм нарушения сперматогенеза после моделирования терминальных состояний и точки приложения актовегина и мексидола в раннем постреанимационном периоде.

**Схема механизма нарушения сперматогенеза в
постреанимационном периоде после моделирования острой
гипобарической гипоксии и клинической смерти и точки приложения
Актовегина и Мексидола**



Условные обозначения:

A – актовегин; M – мексидол;

«+» - стимулирующий эффект; «-» - блокирующий эффект;

СРО – свободнорадикальное окисление;

АОС – антиоксидантная система.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленные тканеспецифические и общие закономерности повреждения клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига при терминальных состояниях и в постреанимационном периоде указывают на необходимость проведения доклинических и клинических испытаний существующих и поиска новых фармакологических препаратов для комплексной терапии постреанимационных расстройств.

2. Разработанная концепция о влиянии антигипоксантов метаболического действия на сперматогенез должна быть учтена в практической медицине для обоснования курсового назначения препаратов.

3. Введение препаратов метаболической поддержки (актовегин, мексидол) при терминальных состояниях необходимо начинать в условиях реанимации на догоспитальном этапе или в палате интенсивной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Терминальные состояния приводят к выраженным и длительным нарушениям сперматогенеза, что проявляется уменьшением числа всех клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и клеток Лейдига в ткани тестикул. Нарушения гаметогенеза сопровождаются количественными и качественными изменениями эякулята.

2. Степень повреждения клеток ткани тестикул зависит от способа моделирования терминального состояния. Более значительные изменения клеточного состава наблюдаются после моделирования терминального состояния путем пережатия сердечно-сосудистого пучка, чем после острой гипобарической гипоксии.

3. Общим патогенетическим звеном ранних постреанимационных повреждений клеток сперматогенного эпителия, а также клеток Сертоли и Лейдига является формирование окислительного стресса, приводящего к окислительной модификации белков и липидов.

4. Показано, что после ишемического воздействия интенсивность перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в ткани тестикул выше, чем после гипоксического.

5. Установлено, что в раннем постгипоксическом периоде высокие концентрации лактата в ткани семенника поддерживают относительную стабильность клеточного состава тестикул и стимулируют деление сперматоцитов.

6. Выявлено, что в постреанимационном периоде после ишемического и гипоксического воздействия уменьшение количества клеток Сертоли сопровождается снижением концентрации лактата и повышением концентрации пирувата в ткани семенников, что ведет к уменьшению количества клеток сперматогенного эпителия. Обнаружена высокая обратная корреляционная зависимость между концентрацией пирувата и количеством герминативных клеток ($r = -0,82 - 0,59$).

7. Применение актовегина в ходе реанимационных мероприятий приводит к полному восстановлению сперматогенеза на 21 сутки постгипоксического периода и на 45 сутки постишемического периода. Это обусловлено тем, что актовегин снижает уровень перекисного окисления белков и липидов в ткани тестикул, тем самым предохраняет от повреждения и гибели клетки сперматогенного эпителия, клетки Сертоли и Лейдига, а также предупреждает резкое снижение уровня лактата в ткани семенников.

8. Применение мексидола в реанимационном периоде приводит к значительному снижению окислительной деструкции липидов и белков, что сопровождается ускорением восстановительных процессов в ткани тестикул.

9. Влияние мексидола на процессы деления и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия после ишемического и гипоксического воздействий, по сравнению с актовегином, выражено в меньшей степени. Использование мексидола в реанимационном периоде сопровождается снижением в ткани тестикул уровня лактата, который является основным энергетическим субстратом для клеток сперматогенного эпителия. Сперматогенез к 60 суткам наблюдения не восстанавливается.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рыжаков, Д.И. Гипоксия и сперматогенез / Д.И. Рыжаков, Т.Е. Потемина, О.Н. Шевантаева [и др.] // Материалы III международной конференции «Гипоксия в медицине». – Москва, 1998. – С. 60.

2. Рыжаков, Д.И. Мужская репродуктивная система при гипобарической гипоксии / Д.И. Рыжаков, О.Н. Шевантаева // Тез. докл. Второй Российский конгресс по патофизиологии. – Москва, 2000.- С. 123.

3. Мухина, И.В. Роль гипоксического фактора в формировании реперфузионных повреждений органов в постреанимационном периоде / И.В. Мухина, О.Н. Шевантаева, Ю.И. Косюга, Ю.В. [и др.] // Тез. докл. Второй Российский конгресс по патофизиологии. – Москва, 2000. - С. 301.

4. Рыжаков, Д.И. Адаптивные изменения сперматогенеза в постреанимационном периоде / Д.И. Рыжаков, О.Н. Шевантаева, С.В. Кузнецова [и др.] // Материалы XI международного симпозиума «Эколого-физиологические проблемы адаптации». - Изд-во Российского университета дружбы народов. – 2003. - С.452 - 453

5. Шевантаева, О.Н. Механизмы нарушения сперматогенеза в постреанимационном периоде / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, Ю.И. Косюга, А.С. Шорина // Тез. докл. Третий Российский конгресс по патофизиологии. – Москва, 2004. – С. 207.

6. Шевантаева, О.Н. Возможность коррекции нарушений сперматогенеза после острой гипобарической гипоксии / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, Ю.И. Косюга, М.В. Баландина // Тез. докл. Четвертая Российская конференция с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». – Москва, 2005. – С. 120 -121.

7. Рыжаков, Д.И. Медико-социальное значение, этиология и патогенез мужского бесплодия / Д.И. Рыжаков, О.Н. Шевантаева // Нижегородский медицинский журнал. - 2005. - №1. - С. 170 – 173.
8. Шевантаева, О.Н. Влияние острой гипобарической гипоксии на показатели спермограммы в эксперименте / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, С.В. Кузнецова // Нижегородский медицинский журнал. -2005. - №2. - С.43 – 45.
9. Шевантаева, О.Н. Репродуктивная система самцов белых крыс после перенесенной клинической смерти / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, И.В. Мухина // Нижегородский медицинский журнал. – 2006. – №1. – С.41 - 44.
10. Шевантаева, О.Н. Влияние мексидола на состояние сперматогенеза самцов белых крыс после моделирования клинической смерти / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, И.В. Мухина, Ю.И. Косюга // Нижегородский медицинский журнал. – 2006. - №2. – С.105 – 108.
11. Шевантаева, О.Н. Влияние актовегина на сперматогенез самцов белых крыс после моделирования клинической смерти / О.Н. Шевантаева, Ю.И. Косюга // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. - №2. – С.40 - 43.
12. Шевантаева, О.Н. Влияние острой гипобарической гипоксии на сперматогенез и уровень лактата в ткани семенников самцов белых крыс / О.Н. Шевантаева, Ю.И. Косюга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. - №1. – С.24 – 27.
13. Шевантаева, О.Н. Нарушение сперматогенеза в ранние и поздние сроки постреанимационного периода / О.Н. Шевантаева // Актуальные вопросы современной медицины: теория и практика: Сборник статей / Под ред. Б.Е. Шахова. – Нижний Новгород: Изд-во НГМА – 2006. – С.115 – 120.
14. Shevantaeva, O.N. The state of spermatogenesis in white male rats at different periods after extremal hypoxic influences / O.N. Shevantaeva, D.I. Ryzhakov, Yu.I. Kosyuga // VIII World congress of adaptive medicine June 21 – 24 2006. – Moscow. – 2006. P.97 - 98.
15. Влияние внешних факторов на мужскую репродуктивную систему: учебно-методическое пособие / Т.Е. Потемина, О.Н. Шевантаева, С.В. Кузнецова; под ред. Д.И. Рыжакова. – Н.Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. – 28 с.
16. Потемина, Т.Е. Экологозависимость мужской infertility / Т.Е. Потемина, Д. И. Рыжаков, О.Н. Шевантаева // XII межд. Симпозиум «Эколого – физиологические проблемы адаптации» - Москва, 2007. – С.351 – 352.
17. Шевантаева, О.Н. Дизрегуляторные нарушения сперматогенеза после моделирования острой гипобарической гипоксии / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, Ю.И. Косюга // «Дизрегуляторная патология» объединенный пленум Российского и Московского научных обществ патофизиологов, Научного совета по общей патологии и патофизиологии РАМН и Минздравсоцразвития РФ, посвященный 85-летию академика РАМН Г.Н. Крыжановского. Патогенез, приложение №1, 2007. – С.26.

18. Olga N. Shevantaeva, Yury I. Kosuyga, Igor V. Chelyshev. The state of spermatogenesis in white male rats after acute hypoxic and ischemic influences // Cell Differentiation / Laura B. Ivanova. - Nova Science Publishers, 2008, - P.125 – 150.

19. Шевантаева, О.Н. Возможность коррекции нарушений сперматогенеза в раннем постреанимационном периоде / О.Н. Шевантаева // Пятая Российская конференция «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Москва, 9 – 11 октября, 2008. Патогенез. – 2008. - №3. – С. 95.

20. Шевантаева, О.Н. Изменения сперматогенеза в условиях гипобарической гипоксии и ишемии / О.Н. Шевантаева // Нижегородский медицинский журнал. – 2008. - №4 – С.129 – 134.

21. Шевантаева, О.Н. Коррекция постишемических реперфузионных нарушений сперматогенеза / О.Н. Шевантаева // Вестник восстановительной медицины. – 2008. - №6. – С.39 – 42.

22. Потемина, Т.Е. Влияние экстремальных психогенных факторов на мужскую фертильность / Т.Е. Потемина, Л.Э. Курочицкая, А.А. Зуйкова, О.Н. Шевантаева // Вестник восстановительной медицины. – 2009. - №1 – С.32 – 35.

23. Шевантаева, О.Н. Адаптационные изменения сперматогенеза после экстремального гипоксического воздействия / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, Ю.И. Косюга // XIV международный симпозиум «Эколого-физиологические проблемы адаптации» - Москва, - 2009. – С.463.

24. Шевантаева, О.Н. Влияние терминальных состояний на сперматогенез самцов белых крыс / О.Н. Шевантаева, Д.И. Рыжаков, Ю.И. Косюга, И.В. Мухина // VI Российский конгресс «Мужское здоровье» с международным участием – Москва, - 2010. – С.209 – 210.

25. Шевантаева, О.Н. Роль окислительного стресса в патогенезе нарушений сперматогенеза в постреанимационном периоде / О.Н. Шевантаева, К.Н. Конторщикова, Ю.И. Косюга // Современные технологии в медицине. - 2011. - №3. – С.27 – 30.

26. Шевантаева, О.Н. Использование цитоморфологических методов для оценки состояния сперматогенеза при гипоксических воздействиях / О.Н. Шевантаева, Ю.И. Косюга // Современные технологии в медицине. - 2011. - №4. – С.151 – 153.

27. Шевантаева, О.Н. Сравнительная оценка морфологических и метаболических изменений в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде / О.Н. Шевантаева, Ю.И. Косюга // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. - №4. – С.32 – 35.

РЕЗЮМЕ

докторской диссертации О.Н. Шевантаевой
«Сперматогенез после экстремальных гипоксических и ишемических
воздействий и возможность его медикаментозной коррекции в
эксперименте».

Терминальные состояния и последующая реанимация приводят к выраженным нарушениям сперматогенеза, что проявляется уменьшением числа всех клеток сперматогенного эпителия, клеток Сертоли, а также клеток Лейдига в ткани тестикул. Степень повреждения клеток ткани тестикул зависит от способа моделирования терминального состояния. Более значительные изменения клеточного состава наблюдаются при моделировании терминального состояния путем пережатия сердечно-сосудистого пучка, чем после острой гипобарической гипоксии. Общим патогенетическим звеном ранних постреанимационных повреждений клеток является активация процессов перекисного окисления липидов и белков. Установлено, что высокий уровень лактата в тканях тестикул в первые часы после острой гипобарической гипоксии повышает устойчивость герминативных клеток к повреждающему действию свободных радикалов и обеспечивает большую сохранность клеточного состава тестикул, чем после моделирования клинической смерти. Показано, что раннее применение метаболитических препаратов с комплексными антигипоксическими и антиоксидантными свойствами способствует сохранению на более высоком уровне количества клеток тестикул в постреанимационном периоде, что в дальнейшем способствует быстрым восстановительным процессам. Причем, сперматогенез быстрее восстанавливается после применения актовегина, чем мексидола. Цитопротекторное действие актовегина связано не только с уменьшением уровня свободных радикалов, но и с увеличением уровня лактата в ткани тестикул в раннем постреанимационном периоде.

SUMMARY

of the dissertation "Spermatogenesis after exposure to extreme hypoxia and ischemia and feasibility of its medicinal correction in experimental conditions" by O.N. Shevantaeva.

Terminal conditions and subsequent resuscitation lead to severe disruption of spermatogenesis, which manifests as a decrease in the number of cells of spermatogenic epithelium, Sertoli cells and Leydig cells in testicular tissue. The degree of damage of testicular tissue cells depends on the type of the terminal condition. More significant changes in cellular composition are observed in the case of simulation of the terminal condition by clamping the cardio-vascular bundle than after acute hypobaric hypoxia. The common pathogenic factor of early post-reanimation cell damage is hyperactivity of lipid and protein peroxidation. It has

been found that lactate intratesticular level decreased during first hours after clinical death modeling whereas it elevated after acute hypobaric hypoxia modeling; it provided the more expressed preservation of germ cells in the second case. We demonstrated that early application of medicines with both anti-hypoxic and anti-oxidative properties contributes to preservation of testicular cells count at higher level during post-reanimation period and favors rapid recuperation process afterwards. Actovegin restores spermatogenesis faster, than Mexidol. The cytoprotective action of Actovegin is due to decrease of free radicals level and elevation of lactate level in testicular tissue during early post-reanimation period.