

На правах рукописи



Сулайманова Римма Тагировна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГОНАД МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТОВ
ЭСТРОГЕНОВОГО РЯДА В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и
ТОКСИКОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Ставрополь - 2023

Работа выполнена в Частном учреждении образовательной организации высшего образования Университет «Реавиз»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор,
профессор РАН
Квочко Андрей Николаевич

Официальные оппоненты: **Косовский Глеб Юрьевич,**
доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева», директор

Сеин Олег Борисович,
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Курский государственный аграрный университет имени И.И. Иванова», профессор кафедры хирургии и терапии

Айбазов Али-Магомет Муссаевич,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства (ВНИИОК) ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», заведующий лабораторией воспроизводства и репродуктивных технологий

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»

Защита состоится «01» марта 2024 г. в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 35.2.036.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г. и размещен на сайтах: ВАК Министерства науки и высшего образования РФ <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> «___» _____ 2023 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» <https://stgau.ru/> «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета

Шулунова Ангелина Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы и степень ее разработанности

Интенсификация производства и сложившиеся экономические проблемы в аграрном секторе и, в частности, в промышленном животноводстве требуют изыскания новых подходов к прогнозированию, изучению и нивелированию возможных отклонений в животном организме с целью повышения их продуктивных качеств, особенно у особей с высоким генетическим потенциалом.

В зоотехнической практике и ветеринарной медицине при воспроизводстве генетически устойчивого потомства высокопродуктивных животных к внешним отрицательным факторам среды обитания и при родоразрешении достаточно широко применяются стероидные гормоны, (Окутин А. С., Куликова Н. И., Заманов Х. З., Попов Д. В., Очиров Б. В., Косовский Г. Ю., 2019; Павленко О. Б., Остриков Д. А., Острикова Э. Е., Засемчук И. В., 2023).

Установлено, что пренатальное применение эстрогенов является одной из причин гормонально зависимых нарушений и может способствовать развитию патологических нарушений репродуктивных органов потомства (Liu J. et al., 2018; Karzi V. et al., 2021).

Физиологическая гиперэстрогения в материнской и фетальной крови является отличительной чертой в пренатальный период развития млекопитающих. Биологическая целесообразность этого явления, обуславливаемого материнской эндокринной системой и производством половых гормонов плацентой, неразрывно связана с гормональным обеспечением физиологического течения беременности (Милованов А. П., Савельева С. В., 2006; Domonkos E., Borbélyová V. et al., 2017).

Внутренние факторы системы «мать – плацента - плод», равно как и внешние, способны изменить концентрацию эстрогенов в фетальной крови и привести не только к моделирующим, но и к провоцирующим эффектам как самих гормонов (Рыжавский Б. Я., 1999; Савченков Ю. И., 1980), так и их метаболитов на молекулярно-генетическом уровне в эстроген-чувствительных тканях (Chappell N. R., Zhou B. et al., 2020; Rosenfield R. L., 2020). Кроме этого, воздействие на материнский организм отрицательных факторов во время беременности дает основания для изучения возможных отклонений в развитии потомства в пренатальный период, поскольку именно в это время формируются и закладываются основы репродуктивного здоровья млекопитающих (Сеин О. Б., Ершов Р. А., Субботина Н. Н., 2022; Потапова С. Н., Кадиков И. Р., Корчемкин А. А. и др., 2021; Abdel-Wahab A., Hassanin K. M. A., Ibrahim S. S. et al., 2021; Jorgensen E. M., Alderman M. H., Taylor H. S., 2011; Wei Y., Han C., Li S. et al., 2020).

Одним из подходов повышения эффективности использования генетических ресурсов, сохранения генофонда высокопродуктивных и исчезающих видов животных является применение вспомогательных репродуктивных биотехнологий, сопровождающихся применением гормональной стимуляции и терапии функциональных нарушений (Айбазов А. М. М., Мамонтова Т. В., Сердюков И. Г., Губаханов М. А., 2022; Findlay J. K., Holland M. K., Wong B. V. M., 2019). Однако изменения уровня гормонов могут привести к необратимым

морфологическим нарушениям и дальнейшему девиантному развитию органов и систем в постнатальном онтогенезе (Barker D. J., 1998).

Важным аспектом применения эстрогенов и антиэстрогенов в акушерстве и гинекологии животных, с учетом их потенциального отсроченного в онтогенезе воздействия на плод, являются используемые дозы препаратов (Сулайманова Р. Т., 2019; Сулайманова Р. Т., 2020; Квочко, А. Н., Сулайманова Р. Т., 2023). Они могут оказывать моделирующие и терапевтические эффекты. Однако стандартные или многократно апробированные эффективные экспериментальные модели использования различных доз эстрогенов противоречивы (Сулайманова Р. Т., Квочко А. Н., Аширкаева Е. С., 2023).

В связи вышеизложенным, исследование морфологии гонад потомства в условиях воздействия различных доз препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов в период их пренатальной закладки и формирования, является актуальной научной проблемой, имеющей важное научно-практическое значение для разработки вспомогательных репродуктивных технологий с целью повышения эффективности использования генетических ресурсов, сохранения генофонда высокопродуктивных и исчезающих видов животных.

Цель исследования

Изучить морфологические изменения гонад млекопитающих при экспериментальном воздействии препаратов эстрогенового ряда в пренатальном периоде.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальные модели и определить влияние доз препаратов с эстрогеноподобным и антиэстрогенным воздействием, вводимым в период беременности на структурно-функциональную организацию яичников и семенников потомства белых беспородных лабораторных мышей.

2. Определить соматометрические показатели потомства белых беспородных лабораторных мышей при воздействии разных доз препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов на материнский организм.

3. Изучить в эксперименте морфологические изменения в яичниках потомства белых беспородных лабораторных мышей при воздействии на материнский организм разных доз препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов.

4. Выявить морфологические изменения в семенниках потомства белых беспородных лабораторных мышей при воздействии на материнский организм разных доз препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов.

5. Оценить изменения маркера пролиферации (Ki-67), ингибитора апоптоза (Bcl-2) и индуктора апоптоза (p53) в яичниках и семенниках потомства при пренатальном воздействии препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов в эксперименте.

Объект исследований. Яичники и семенники белых беспородных лабораторных мышей, рожденных от матерей, подвергшихся экспериментальной гормональной нагрузке во время беременности.

Предмет исследований. Морфофункциональные и иммуногистохимические показатели яичников и семенников потомства самок белых беспородных лабораторных мышей, подвергшихся воздействию разных доз препаратов эстрогенового (синэстрол) и антиэстрогенового (фулвестрант) рядов во время беременности.

Научная новизна. Впервые разработаны и запатентованы 2 способа моделирования в эксперименте возможных отдаленных последствий на гонады потомства при введении в материнский организм препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов («Патент (изобретение) № RU2676437 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28 (2006.01). Способ моделирования проканцерогенного действия синэстрола на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей: № 2018100495 : заявл. 09.01.2018: опубл.: 28.12.2018 – 16 с.», «Патент (изобретение) № RU2722988 С1 Российская Федерация, МПК А61М 5/32 (2006.01), А61К 31/565 (2006.01), А61Р 43/00 (2006.01), G09В 23/28 (2006.01). Способ моделирования проканцерогенного действия фулвестранта на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей : № 2019137152 : заявл. 19.11.2019: опубл. : 05.06.2020 – 16 с.»).

Дано научное обоснование возникновения возможных повреждений в яичниках и семенниках потомства при применении препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов матерям в период беременности с целью получения высокопродуктивного потомства и исчезающих видов животных методом экстракорпорального оплодотворения.

Получены новые сведения о разной степени соматометрических изменений в общих размерах тела и его частей у рожденного потомства на фоне применения матерям препаратов синэстрол и фулвестрант.

Впервые установлено, что введение веществ с эстрогенной и антиэстрогенной активностью приводит к различным патологическим нарушениям в структурной организации яичников и семенников.

В эксперименте доказано, что органы репродуктивной системы потомства мужского пола на структурном уровне подвержены изменениям в меньшей степени, чем у особей женского пола.

Впервые на клеточном и субклеточном уровнях, с использованием иммуногистохимического метода, в яичниках и семенниках потомства на фоне применения различных доз синэстрола и фулвестранта беременным матерям установлены экспрессии маркеров пролиферации (Ki-67), ингибитора апоптоза (Bcl-2) и индуктора апоптоза (p53). Исследование экспрессии маркеров в тканях яичников и семенников потомства выявило пролиферативные изменения, апоптотическую гибель клеток и повреждения в эндокринном аппарате, которые можно рассматривать как морфофункциональные предикторы нарушений их функции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Научно-теоретическая значимость полученных результатов заключается в том, что разработаны и запатентованы модели развития возможных отклонений при воздействии стероидных гормонов на материнский организм во время

беременности, приводящие к структурным изменениям в яичниках и семенниках потомства, которые вызывают нарушения репродуктивной функции. Выявлена нелинейная дозозависимость стероидных гормонов, приводящая к различной степени структурных изменений на макроскопическом и микроскопическом уровнях.

В результате исследований расширены сведения о влиянии препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов на соматометрические показатели потомства белых беспородных лабораторных мышей, а также на микроструктуру их гонад.

Научно-практическое значение результатов исследования состоит в определении доз препаратов как эстрогенной, так и антиэстрогенной направленности, которые приводят к структурным нарушениям на макро- и микроскопическом уровнях в яичниках и семенниках потомства. Их применение должно быть обоснованным и осуществляться с учетом индивидуального гормонального фона матери.

Полученные научно-практические результаты могут использоваться зооветеринарными специалистами при разработке и совершенствовании методических подходов в выполнении экстракорпорального оплодотворения у высокопродуктивных животных и при воспроизводстве исчезающих видов, а также для подготовки справочных, научно-практических и учебных пособий по биологии, морфологии, физиологии, патофизиологии, ветеринарному акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных, чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий в учебных заведениях биологического профиля.

Методология и методы исследования

Методология базировалась на анализе российских и иностранных научных трудов в области исследования проблемы пренатального программирования репродуктивного здоровья потомства при воздействии эстрогенов и антиэстрогенов. Она включала комплексный подход и системный анализ результатов с использованием соматометрических, микроморфологических параметров и их сопоставления с данными морфометрического и иммуногистохимического исследования. Примененные в работе методы экспериментального исследования включали: соматометрические, морфологические (компьютерная морфометрия исследуемых препаратов, световая микроскопия и иммуногистохимия с количественной оценкой результатов) и статистический анализ полученных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Введение различных доз препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов беременным самкам на стадии E11.5 отражает нелинейности структурных изменений яичников и семенников у потомства на макроскопическом и микроскопическом уровнях.

2. Характер изменений в структурно-функциональной организации яичников и семенников потомства в постнатальном онтогенезе при однократном

введении препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов беременным самкам лабораторных мышей зависит от дозы вводимых препаратов.

3. У потомства женского пола, полученного от беременных самок лабораторных мышей при однократном применении препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов, морфологические нарушения в постнатальном периоде развития гонад по степени и уровням проявления более выражены по сравнению с потомством мужского пола.

4. Экспрессия маркера пролиферации (Ki-67), ингибитора апоптоза (Bcl-2) и индуктора апоптоза (p53) в гонадах потомства на субклеточном уровне отражает степень повреждений при применениях препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов, вводимых беременным самкам на стадии E11.5.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов диссертационного исследования и обоснованность выводов подтверждаются достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленной цели и задачам в работе. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации.

Основные положения работы представлены и обсуждены на XII объединенном конгрессе международной ассоциации морфологов и VII съезде Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Тюмень, 2014); The 6th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (Rijeka, Croatia, 2014); 7th International symposium of clinical and applied anatomy (Bratislava, Slovakia, 2015); 112th Annual meeting/32. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft (Würzburg, Germany, 2017); Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека» (Оренбург, 2017); The 10th International Symposium on Clinical and Applied Anatomy (ISCAA; Санкт-Петербург, 2018); Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2018); XXVI International Symposium of Morphological Sciences (Prague, Czech, 2018); XX Congreso de Anatomía del Cono Sur XVI Simposio Ibero-latinoamericano de Terminología anatómica, histológica y embriológica XII Jornadas Chilenas de anatomía — IV Encuentro regional de morfología (Pucon, Chile, 2018); VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); Всероссийской научной конференции «Клиническая анатомия и экспериментальная хирургия: итоги и перспективы» (Оренбург, 2019); 27th International Symposium of Morphological Sciences — ISMS 2021 (Aktobe, Kazakhstan, 2020); Конференции «Современные проблемы морфологии» (Москва, 2020); Расширенном Пленуме НМОАГЭ России «Инновационные образовательные технологии при преподавании морфологических дисциплин в условиях пандемии COVID-19» (Москва, 2020); Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2021); III Международная научно-практическая

конференция «Бородинские чтения» (г. Новосибирск, 2022 г.); Симпозиум по морфологии ребенка «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, 2022).

Материалы диссертационной работы вошли в методические рекомендации: «Морфологическая и иммуногистохимическая оценка яичников при введении эстрогенов в пренатальном периоде» и «Морфология и иммуногистохимия семенников животных при введении эстрогенов в пренатальном периоде», рассмотрены и утверждены на заседании учебно-методической комиссии факультета ветеринарной медицины и биотехнологического факультета ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ, (протокол № 6 от 15 мая 2023 г.) и Научно-методического совета при Федеральном учебно-методическом объединении по укрупненной группе специальностей и направлению подготовки высшего образования «Ветеринария и зоотехния» (протокол № 37 от 16 мая 2023 г.).

Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс и научные исследования в 18 вузах РФ: в ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», «Частное учреждение образовательная организация высшего образования «Университет РЕАВИЗ»», ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени Императора Петра I», ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Хакасский государственный аграрный университет им. Н.Ф. Катанова», ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина», ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», ФГБОУ ВО «Верхневолжский государственный агробиотехнологический университет», ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА» им. К.И. Скрябина, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского», ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия», ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», ФГАОУ ВО РУДН «Аграрно-технологический институт», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет».

Результаты исследований внедрены и используются как справочный материал в практической деятельности ветеринарных специалистов ветеринарной клиники «ВетЭксперт» (г. Ставрополь).

Личный вклад автора. Заключается в непосредственном участии соискателя во всех этапах работы над диссертационным исследованием. Автором представлена степень изученности предстоящего исследования в научной литературе, определена научная проблема, цель, задачи и модель исследования. Автором лично планировались, организовывались и проводились все экспериментальные работы, с использованием соматометрических, гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов на современном сертифицированном оборудовании в течение 10 лет. Автор

осуществлял статистическую обработку, анализ, обобщение полученных результатов и формулировку выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы. Доля участия соискателя при выполнении диссертационной работы составляет 85 %.

Публикация. По материалам исследований опубликовано 56 научных работ, в которых отражены основные положения и выводы по теме диссертации, в том числе 15 работ в изданиях, включенных в Перечень Российских рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций («Ветеринарный фармакологический вестник», «Вестник КрасГАУ», «Вестник АПК Ставрополя», «Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство», «Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии», «Известия Оренбургского государственного аграрного университета», «Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии», «Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки», «Морфология») и 3 статьи в научных изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus.

Получены 2 патента РФ: «Патент (изобретение) № RU2676437 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28 (2006.01). Способ моделирования проканцерогенного действия синэстрола на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей: № 2018100495 : заявл. 09.01.2018: опубл.: 28.12.2018 – 16 с.», «Патент (изобретение) № RU2722988 С1 Российская Федерация, МПК А61М 5/32 (2006.01), А61К 31/565 (2006.01), А61Р 43/00 (2006.01), G09В 23/28 (2006.01). Способ моделирования проканцерогенного действия фулвестранта на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей : № 2019137152 : заявл. 19.11.2019: опубл. : 05.06.2020 – 16 с.». Изданы - 1 монография и 2 учебно-методические рекомендации с грифом учебно-методической комиссии факультета ветеринарной медицины и биотехнологического факультета ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ, (протокол № 6 от 15 мая 2023 г.) и Научно-методического совета при Федеральном учебно-методическом объединении по укрупненной группе специальностей и направлению подготовки высшего образования «Ветеринария и зоотехния» (протокол № 37 от 16 мая 2023 г.).

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 257 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа сопровождается 122 рисунками и 37 таблицами. Список литературы включает 408 наименований (196 отечественных и 212 иностранных).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен анализ научной литературы по воздействию гормонов, синтетических эстрогенов и их аналогов в период внутриутробного развития

плода, соматометрические показатели потомства в постнатальном онтогенезе при воздействии эстрогенов на материнский организм, характеристика вредных факторов среды, влияющих на деятельность репродуктивной системы, воздействие эстрогенов на репродуктивную систему потомства.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе изложены методы проведения пренатальных экспериментальных исследований на белых беспородных лабораторных мышах, а также применение методов исследований в постнатальном онтогенезе: соматометрических, гистологических, иммуногистохимических (ИГХ), морфометрических и статистических на полученном потомстве экспериментальных животных.

2.1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем разделе представлены методы проведения пренатальных экспериментальных исследований на белых беспородных лабораторных мышах, а также применение методов исследований в постнатальном онтогенезе: соматометрических, гистологических, иммуногистохимических (ИГХ), морфометрических и статистических на полученном потомстве экспериментальных животных.

Экспериментальные исследования выполнялись на 267 белых беспородных лабораторных мышах. При работе с экспериментальными животными руководствовались Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Одобрено Экспертным советом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Башкирский ГМУ» Минздравсоцразвития России (протокол № 3 от 17.03.2014). Все экспериментальные манипуляции выполнены в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding Principals for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990), а также Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция 2000 г.).

Настоящее исследование было выполнено в соответствии с темой научно-исследовательской работы «Морфологические особенности репродуктивной функции млекопитающих в условиях воздействия экологических факторов» (регистрационный номер НИОКТР 01201463136, дата регистрации — 19.05.2014).

Выбор данной модели лабораторных животных связан с широким использованием их в биомедицинских исследованиях (около 59% общего числа используемых животных), они сохраняют почти 99% человеческих генов и физиологически напоминают человека, беременность мышей длится довольно короткий срок (19–21 дней), что позволяет получить потомство в сжатые сроки (Dutta S., Sengupta P., 2016).

Экспериментальные животные получены из питомника ГУП ДП ПСХ «Питомник лабораторных животных», расположенный по адресу: Республика Башкортостан, Чишминский район, с. Горный. Экспериментальные животные содержались на сбалансированном пищевом рационе при свободном доступе к

воде и пище. Условия вивария и содержания животных соответствуют РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений», другим санитарным нормам и требованиям ветеринарного контроля и надзора работ с лабораторными и экспериментальными животными (лицензия № 99-04-000097 от 25.01.2005 Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (справка представлена от филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Уфа НПО «Иммунопрепарат» от 11.03.2014).

Белые беспородные лабораторные мыши были разделены на 9 экспериментальных групп, в каждой из них было по 3 самки в эструсе и 1 самец. Для увеличения количества животных (потомства) эксперимент был проведен в три этапа.

Все самки экспериментальных групп были репродуктивного возраста с нормальным течением эстрального цикла. Определение стадий цикла проводилось по соотношению клеточных элементов в вагинальном мазке на основе характеристики эстрального цикла (Cora M. C., Kooistra L., Travlos G., 2015). Классификация периодов жизни мышей: период новорожденности (1–5 дни), подсосный период (6–21 дни), период полового созревания (22–50 дни), период половой зрелости (после 60-го дня) (Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк, Б. В. 1983).

Самок мышей в эструсе подсаживали на одни сутки к половозрелым самцам для инициации беременности. Фиксацию начала беременности считали с 12 часов предыдущего дня до 12 часов последующего. Первый день подсадки считали нулевым днем, второй день считали первым днем беременности.

Процедуру эстрального цикла в потомстве белых беспородных лабораторных мышей в экспериментальных и контрольных группах прослеживали с соблюдением правила «одного часа» с составлением анализа продолжительности эстрального цикла, равномерности их чередования и периодов отдельных фаз.

Беременных самок белых беспородных лабораторных мышей выявляли на 2–5-й день экспериментального исследования методикой, которая основана на оценке влагалищного содержимого по наличию «влагалищной пробки», состоящей из секрета добавочных половых клеток самца.

Экспериментальные исследования подтвердили, что «каждая стадия изучаемого полового цикла характеризуется определенным клеточным составом влагалищного мазка» (Leng Z., Moore D. E., Mueller V. A. et al., 1998).

Анализ влагалищных мазков изучали при использовании инвертированного биологического микроскопа для лабораторных исследований Axioobserver со штативом D1 компании-производителя Carl Zeiss Microscopy GmbH (Германия), со специализированным программным обеспечением ZEN 2018 при увеличении 100x10.

По данным В. Н. Бабичева: «половое созревание у мышей наступает на 60-й день, периодом половой зрелости считается 90-й день» (Бабичев В. Н., 1981).

«Эстральный цикл у экспериментальных животных разбивается на следующие друг за другом стадии: стадия покоя — диэструс; стадия подготовки к течке (предтечка) — проэструс; течка — эструс; «послетечка» — метаэструс» (Захидов С. Т., Гопко А. В., Маршак Т. Л. и др., 2007).

Учитывая, что стадии проэструса и метаэструса (6 и 12 часов, соответственно) являются короткими, эстральную цикличность исследовали по более продолжительным фазам (эструс, диэструс). Исследование фазы «эструс» показало, что мазок состоит из ороговевших безъядерных эпителиальных клеток (>90%); в стадии диэструс в мазке наблюдаются в основном лейкоцитарные клетки (>60 %) и редкие эпителиальные клетки (Клочков Д. В., Алехина Т. А., Прокудина О. И., 2011).

Следующим этапом было введение экспериментальной дозы исследуемых препаратов, при выборе которых учитывали высокий уровень основного обмена мелких экспериментальных животных, проницаемость препарата через плаценту и метаболизм. Принимая во внимание физиологическую экспрессию гормонов мышцей, каждой самке в отдельности на 11 сутки (стадия эмбрионального развития E11.5) пренатального периода в одно и то же вечернее время суток вводили исследуемый препарат (Болтовская М. Н. и др., 2014; Flurkey K., Currer J. M., Harrison D. E. et al., 2007).

Максимальная суточная доза препарата синэстрол составляет 100 мг (рекомендовано в два приема), по коэффициенту перерасчета (Хабриев Р. У., 2005) максимальная суточная доза синэстрола для экспериментальных животных (мышей) массой 24 г составила 18 мг/кг.

Максимальная суточная доза препарата фулвестрант для человека составляет 500 мг, по коэффициенту перерасчета (Хабриев Р. У., 2005) максимальная разрешенная доза фулвестранта для экспериментальных животных (мышь) массой 24 г составила 87,05 мг/кг. Торговое название — Фазлодекс, производство «Астра-Зенека» (США).

Запатентованы способы моделирования доз действия синэстрола и фулвестранта на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей.

Кормление и уход за беременными экспериментальными белыми лабораторными мышами производились в соответствии с рекомендациями (Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б. В., 1983; Каркищенко Н. Н., Грачев С. В., 2010).

Суточный рацион питания на одну мышь состоял из следующих ингредиентов: зелень, морковь (4 г), сухой корм (8 г), крупа (2 г), хлеб с небольшим количеством сливочного масла (кусочки 1x1 см; 2 г), молоко (7 г), сено (2 г), соль (0,1 г), мел (0,3 г), вода *ad libitum*.

Подстилкой служила мелкая стружка, в качестве гнездового материала использовали техническую вату.

Общее число полученного потомства мужского и женского пола составило 187 всех экспериментальных животных, выживших — 134, выбывших из эксперимента — 53.

Полученное потомство в возрасте 1 месяца отделяли и подращивали выводками, самцов отдельно от самок до момента половой зрелости потомства (Котеров А. Н., Ушенкова Л. Н., Зубенкова Е. С. и др., 2018; S. Dutta, Sengupta P., 2016). Группы помещали в отдельные клетки с соответственной маркировкой вводимого препарата. Самок, родивших потомство, выводили из эксперимента. С целью отбора материала для гистологических и гистохимических исследований убой экспериментальных мышей проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. У полученного потомства после их полового созревания на 90-й день проводили описанные далее исследования.

В ходе диссертационного исследования определяли следующие соматометрические параметры: масса тела (г); длина тела (мм) — расстояние от кончика носа до основания хвоста или анального отверстия; длина «нос — ухо» (мм) — расстояние от носа до основания ушной раковины; длина «ухо — ухо» (мм) — расстояние между основаниями ушной раковины; длина хвоста (мм) — расстояние от анального отверстия до кончика стержня хвоста без учета длины концевых волос; длина стопы правой тазовой конечности (мм) — расстояние от заднего края пятки до конца самого длинного пальца без учета когтя; аногенитальное расстояние (АГР; мм) — расстояние между анальным отверстием и мочеполовым сосочком; аногенитальный индекс (АГИ), рассчитывался по формуле:

$$\text{АГИ} = (\text{АГР}/\text{масса}) \times 100,$$

где АГР — аногенитальное расстояние, мм; масса — масса тела экспериментального животного, г (Drickemer L. C., 1995; Vandenberg J. G., Nuggett C. L., 1995).

Объектом морфологических исследований служили яичники и семенники белых лабораторных мышей, рожденных от животных, подвергшихся экспериментальной гормональной нагрузке во время беременности.

Соматометрические показатели потомства экспериментальных животных исследовали при помощи перечисленных далее приборов: массу тела измеряли с помощью электронных весов марки BW-500 с точностью измерения 0,1 г; автоматическая калибровка; единицы измерений — граммы, унции, караты; габариты — 120×80×25 мм; производитель — Южная Корея; аногенитальное расстояние измеряли при помощи электронного штангенциркуля Digital Caliper со встроенным жидко-кристаллическим дисплеем; диапазон — 0–150 мм; точность — 0,01 мм; производитель — Южная Корея.

Экспериментальное животное фиксировали, удерживая одной рукой за кожу на холке, спине и крестце, стягивая ее в ладонь. При таком способе фиксации кожа в аногенитальной области оказывается плотно натянутой. При помощи электронного штангенциркуля измеряли расстояния от ануса до мочеполового отверстия. Аногенитальное расстояние имеет несколько привлекательных свойств с точки зрения его потенциальной клинической пользы, поскольку является легко доступным и неинвазивным методом исследования, а также используется для оценки репродуктивного статуса.

Зафиксированные яичники были разрезаны вдоль коркового и мозгового слоя, семенники были разрезаны поперечно для исследования извитых семенных канальцев (ИСК), морфометрия структур яичников и семенников подсчитывались на стандартной площади среза органов (Автандилов Г. Г., 1990; Семченко В. В., 2006). Гонады прошли стандартную гистологическую проводку с помощью гистопроцессора Tissue-Tek VIP 5 Jr (Hygesc, Франция) и были залиты в парафин. Экспериментальные срезы изготавливали с помощью микротомы Microm HM 340E (Microm GmbH, Германия), после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия).

Исследование, визуализацию и морфометрию гистологических препаратов яичников и семенников потомства производили с использованием инвертированного биологического микроскопа для лабораторных исследований Axioobserver со штативом D1 компании-производителя Carl Zeiss Microscopy GmbH (Германия), со специализированным программным обеспечением ZEN 2018 (микроскоп был предоставлен Лабораторией клеточных культур Центральной научной исследовательской лаборатории Башкирского государственного медицинского университета (ЛКК ЦНИЛ БГМУ). Для подсчета структурных тканевых элементов в гонадах потомства, использовался иммерсионный объектив 90x, на стандартных полях зрения (Автандилов Г. Г., 1990; Семченко В. В., 2006). Фотосъемку гистологических препаратов производили цифровой камерой AxioCam MRc5 (ZEISS, Япония).

Определяли следующие микроморфометрические параметры яичника (морфометрические измерения исследованных структур проводили на всей площади среза яичника) (Автандилов Г. Г., 1990): среднюю толщину покровного эпителия среза яичников по центру органа (мкм); среднюю площадь поперечного среза яичников по центру органа (мкм^2); среднюю площадь коркового вещества среза яичников по центру органа (мкм^2); среднюю толщину коркового вещества среза яичников по центру органа (мкм); среднюю площадь мозгового вещества среза яичников по центру органа (мкм^2); среднюю толщину мозгового вещества среза яичников по центру органа (мкм); средний диаметр сосудов микроциркуляторного русла на стандартной площади среза яичников (мкм); среднее количество примордиальных фолликулов на стандартной площади среза яичников; среднее количество первичных фолликулов на стандартной площади среза яичников; среднюю площадь первичных фолликулов; среднее количество вторичных фолликулов на стандартной площади среза яичников; среднюю площадь вторичных фолликулов; среднюю толщину теки, окружающей вторичные фолликулы; среднее количество третичных фолликулов на стандартной площади среза яичников; среднюю площадь третичных фолликулов; среднюю толщину теки, окружающей третичные фолликулы; среднее количество атретических фолликулов на стандартной площади среза яичников; среднее количество желтых тел и среднюю площадь желтых тел; среднее количество лютеиновых клеток в желтом теле на стандартной площади.

Определяли следующие микроморфометрические параметры семенников (морфометрические измерения исследованных структур проводили на всей

площади среза семенника) (Автандилов Г. Г., 1990): среднее количество извитых семенных канальцев в одном поле зрения; среднюю площадь поперечного сечения извитого семенного канальца; средний диаметр извитых семенных канальцев; среднюю толщину сперматогенного эпителия (без различия клеточного состава); среднее количество клеток sustentоцитов в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев; среднее количество сперматогониев в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев; среднее количество сперматоцитов в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев; среднее количество сперматид в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев; среднее количество сперматозоидов в просвете извитых семенных канальцев; среднюю площадь ядер интерстициальных (эндокринных) клеток.

ИГХ-анализ проводили на срезах с парафиновых блоков яичников и семенников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Исследования выполняли на стандартных срезах толщиной 4 мкм. Окрашивание срезов осуществляли с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия) по рекомендованным производителями протоколам Santa Cruz Biotechnology (США). В работе в качестве первичных антител использовали моноклональные мышиные антитела. В качестве вторичных антител применяли непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия).

Оценку окрашенных препаратов осуществляли визуально под световым микроскопом Leica. Для идентификации клеток применяли морфологические критерии: для маркеров Ki-67 — положительную реакцию оценивали по коричневому окрашиванию ядра; для маркера белка p53 — ядра и цитоплазмы; для Vcl-2 — положительную реакцию оценивали по окрашиванию цитоплазмы. Подсчет иммунопозитивных клеток проводили в 10 полях зрения каждого образца при увеличении x100 и x400 (Шарафутдинова Л. А., 2019; Ruifrok A. C., Johnston D. A., 2001). В расчет брали 100 клеток для каждого случая. Количество Ki-67, p53 и Vcl-2-иммунопозитивных клеток подвергали статистической обработке.

При исследовании ИГХ-маркеров определяли следующие параметры яичника: первичный фолликул, вторичный фолликул, третичный фолликул, желтое тело, строму органа.

При исследовании ИГХ-маркеров определяли следующие параметры семенника: клетки сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца; клетки сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца; клетки сперматидов в эпителии извитого семенного канальца; клетки сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца; интерстициальные (эндокринные) клетки.

Статистические данные анализировали в пакете прикладных программ STATISTICA V.7.0 (StatSoftInc, США). Вид распределения признаков в группах оценивали с помощью критерия Шапиро — Уилка (Гланц С., 1999; Ланг Т. А., Сесик М., 2011; Реброва О. Ю., 2003). Сравнение данных, подчиняющихся закону нормального распределения, проводили с помощью параметрического

однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, с последующим сравнением групп с помощью критерия Стьюдента, с поправкой Бенферрони. Для групп, не подчиняющихся нормальному распределению, применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, с последующим сравнением групп с помощью критерия Данна. Для статистической обработки данных вычисляли среднее арифметическое значение параметра и его стандартную ошибку ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ АНАЛИЗ

В разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях самостоятельно и в соавторстве, которые содержат уточненные, расширенные и новые сведения.

2.2.1. Биологические параметры потомства белых беспородных лабораторных мышей

Для оценки выживаемости животных первой серии после однократного внутримышечного введения экспериментальных доз препаратов с эстрогенной активностью проводили наблюдение в течение 25 дней, после производили разделение животных по половому признаку (потомство самцов отделяли от потомства самок).

При однократном внутримышечном введении различных доз препарата с эстрогенной активностью синестрола в первом этапе эксперимента в группе С-25 мкг/кг выжившего потомства осталось 11 из 17 животных, в группе С-40 мкг/кг выжившего потомства осталось 6 из 11 животных, в группе С-50 мкг/кг из четырех родившихся выбыл только один. При однократном внутримышечном введении различных доз препарата с антиэстрогенной активностью препарата фулвестранта в экспериментальной группе Ф-20 мкг/кг из выжившего потомства осталось 14 из 20 животных, в группе Ф-100 мкг/кг выжило только одно животное из помета, в группе Ф-200 мкг/кг выжившего потомства не было.

Во время первого этапа эксперимента наблюдали рождение мертвого потомства при введении препарата фулвестранта в дозе 100 мкг/кг. В клетке, где содержались экспериментальные животные группы Ф-200 мкг/кг, были обнаружены останки части органов новорожденного потомства. В целом по первой серии наблюдали нежизнеспособное потомство, которое даже при надлежащем уходе, согласно требованиям, методическим указаниям по содержанию лабораторных животных, не смогло выжить.

Для достоверного проведения статистической обработки результатов исследования необходимо было провести вторую серию эксперимента. При однократном внутримышечном введении различных доз препарата с эстрогенной активностью синестрола во втором этапе эксперимента в группе С-25 мкг/кг выжившего потомства осталось 4 из 6, в группе С-40 мкг/кг выжившего потомства осталось 9 из 11, в группе С-50 мкг/кг выжившего потомства осталось 5 из 9. При однократном внутримышечном введении различных доз препарата с антиэстрогенной активностью фулвестранта в экспериментальной группе Ф-20 мкг/кг выжило 1 из 6 животных, наблюдали резкий падеж потомства. В группе Ф-

100 мкг/кг было 2 головы помета мужского пола и одна голова женского пола. В группе Ф-200 мкг/кг выжившего потомства осталось 8 из 9.

Из-за гибели потомства женского и мужского пола в экспериментальных группах С-50 мкг/кг, Ф-100 мкг/кг, Ф-200 мкг/кг провели третий эксперимент.

При однократном внутримышечном введении различных доз исследуемых препаратов в третьем этапе эксперимента в группе С-50 мкг/кг выжившего потомства осталось 6 из 7 животных, а в группе Ф-200 мкг/кг осталось также 6 из 7 животных.

Одна из причин репродуктивной патологии — введение во время беременности эстрогенов. Для оценки физиологической зрелости потомства животных интактной, контрольной и экспериментальных групп использовали следующие показатели: число живых родившихся плодов, число случаев фетальной смерти, численность помета, пол.

У потомства самок белых беспородных лабораторных мышей значительно снижалось число новорожденных животных в группах С-40 мкг/кг, С-50 мкг/кг, Ф-100 мкг/кг. Вместе с тем, сравнительный анализ 134 помётов по полу позволил выявить у подопытных животных преобладание женских особей, количество которых составило 68, и уменьшение числа особей мужского пола в количестве 66 животных.

Среди причин изменения числа и соотношения животных по полу в помёте может быть нарушение процессов инактивации половых гормонов и повышение концентрации эстрогенов. У самок белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном воздействии эстрогенов рождалось физиологически незрелое потомство.

Число выживших мышат в помёте в первом и втором экспериментах резко снижается в экспериментальных группах С-50 мкг/кг и Ф-100 мкг/кг в сравнении с интактной группой. Аналогичные данные получены в результате экспериментальных исследований у млекопитающих Ю. И. Савченковым и К. С. Лобынцевым (Савченков Ю. И., Лобынцев К. С., 1980).

Исходя из вышеизложенного, можно констатировать, что введение эстрогенов и стресс материнского организма вызывает комплекс нейрогормональных сдвигов в организме плода, который можно квалифицировать как стрессовое состояние плода (Резников А. Г., Пишак В. П., Носенко Н. Д. и др., 2004; Самусев Р. П., Зубарева Е. В. 2011). В этой связи можно считать правомочным использование словосочетаний «пренатальный стресс» (Ward I. L., 1969) и «синдром пренатального стресса» (Ward I. L., 1984).

2.2.2. Соматометрические промеры потомства белых беспородных лабораторных мышей на фоне пренатального однократного внутримышечного введения синэстрола и фулвестранта

Сравнительный анализ соматометрических показателей потомства женского пола белых беспородных лабораторных мышей при однократном воздействии синтетического препарата синэстрола с интактной группой показал, что в показателе «масса» во всех исследуемых группах значительных изменений не

было. Длина тела (мм) незначительно больше в группе контроля (МО) по сравнению с интактной группой на 3,4 %, в других исследуемых группах значимых различий не выявлено. Длина «нос — ухо» (мм) меньше в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-50 мкг/кг, по сравнению с интактной группой, на 12,6 % ($p \leq 0,05$) и 18,1 % ($p \leq 0,05$), соответственно. Длина «ухо — ухо» (мм) была больше во всех экспериментальных группах С-25 мкг/кг на 41,6% ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг на 42,5 % ($p \leq 0,05$) и в группе С-50 мкг/кг на 38,3% ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой.

Длина хвоста (мм) была меньше во всех исследуемых группах по сравнению с интактной: в группе контроля (МО) на 5,0 %, С-25 мкг/кг на 9,8 % ($p \leq 0,05$), С-40 мкг/кг на 8,9 % ($p \leq 0,05$) и С-50 мкг/кг на 14,4 % ($p \leq 0,05$). Длина стопы правой тазовой конечности (мм) оказалась больше во всех экспериментальных группах по сравнению с интактной группой: в группе С-25 мкг/кг на 24,4 % ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг на 24,4 % ($p \leq 0,05$) и группе С-50 мкг/кг на 25,6 % ($p \leq 0,05$). Величина аногенитального расстояния (мм) потомства женского пола лабораторных мышей при однократном воздействии синтетического препарата синэстрол во всех экспериментальных группах меньше по сравнению с интактной группой: С-25 мкг/кг на 28,4 % ($p \leq 0,05$), С-40 мкг/кг на 31,3 % ($p \leq 0,05$) и С-50 мкг/кг на 22,4% ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ соматометрических показателей потомства женского пола белых беспородных лабораторных мышей при однократном воздействии препарата фулвестрант с интактной группой показал, что масса тела животных увеличивается в таких группах, как Ф-20 мкг/кг на 24,1 % ($p \leq 0,05$) и Ф-200 мкг/кг на 18,4 % ($p \leq 0,05$), снижение данного показателя произошло в группе Ф-100 мкг/кг на 21,4 % ($p \leq 0,05$). Длина тела (мм) животных была меньше в группе контроля (МК) на 5,0 % и в группе Ф-100 мкг/кг на 5,7 % по сравнению с интактной группой. Длина тела животных (мм) больше в экспериментальных группах Ф-20 мкг/кг на 2,6% и Ф-200 мкг/кг на 6,9 % по сравнению с интактной группой. Длина «нос — ухо» (мм) уменьшается во всех исследуемых группах, но достоверно значимое различие произошло в группе Ф-200 мкг/кг на 14,4 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Длина «ухо — ухо» (мм) оказалась выше в экспериментальных группах животных Ф-20 мкг/кг на 12,5 % ($p \leq 0,05$) и Ф-200 мкг/кг на 52,3 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Длина хвоста животных (мм) уменьшается в таких группах, как группа контроля (МК) на 10,0 % ($p \leq 0,05$), Ф-20 мкг/кг на 3,2 % и Ф-100 мкг/кг на 9,6 % по сравнению с интактной. Длина стопы правой тазовой конечности (мм) увеличивается в экспериментальных группах животных Ф-20 мкг/кг на 9,4 % и Ф-200 мкг/кг на 32,9 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Величина аногенитального расстояния (мм) потомства женского пола лабораторных мышей при однократном воздействии препарата фулвестрант во всех исследуемых группах животных была меньше по сравнению с интактной группой: в группе контроля (МК) на 19,4 % ($p \leq 0,05$), Ф-20 мкг/кг на 7,5 % ($p \leq 0,05$), Ф-100 мкг/кг на 13,4 % ($p \leq 0,05$) и Ф-200 мкг/кг на 31,3 % ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ соматометрических показателей потомства мужского пола белых беспородных лабораторных мышей при однократном воздействии синтетического препарата синэстрол с интактной группой показал, что масса была меньше в группе контроля (МО) на 15,9 % ($p \leq 0,05$), в группе С-25 мкг/кг - на 6,2 %, в группе С-40 мкг/кг - на 17,8 %, в группе С-50 мкг/кг - на 17,5 % ($p \leq 0,05$). Длина тела животных (мм) уменьшается в группе контроля (МО) на 5,3%, в группе С-25 мкг/кг - на 14,6 % ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг - на 15,4 % ($p \leq 0,05$), в группе С-50 мкг/кг - на 11,9 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Длина «нос — ухо» (мм) уменьшается в экспериментальных группах животных С-25 мкг/кг на 8,3 % ($p \leq 0,05$), С-40 мкг/кг - на 9,2 % ($p \leq 0,05$) и С-50 мкг/кг - на 9,0 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Длина «ухо — ухо» (мм) увеличивается в экспериментальной группе животных С-50 мкг/кг на 40,8 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Длина хвоста животных (мм) уменьшается во всех исследуемых группах по сравнению с интактной: в группе контроля (МО) - на 5,6%, в группе С-25 мкг/кг - на 12,1 % ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг - на 13,8 % ($p \leq 0,05$) и в группе С-50 мкг/кг - на 12,9 % ($p \leq 0,05$). Длина стопы правой тазовой конечности (мм) увеличивается в группе животных С-50 мкг/кг на 23,4 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Величина АГР (мм) потомства мужского пола лабораторных мышей при однократном воздействии синтетического препарата синэстрол уменьшается в группе контроля (МО) на 5,5% ($p \leq 0,05$), в группе С-25 мкг/кг - на 2,7 % ($p \leq 0,05$) и в группе С-50 мкг/кг - на 15,2 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой.

Сравнительный анализ соматометрических показателей потомства мужского пола белых беспородных лабораторных мышей при однократном воздействии препарата фулвестрант показал, что масса тела животных уменьшается во всех исследуемых группах по сравнению с интактной группой: в контрольной группе (МК) - на 20,9 %, в группе Ф-20 мкг/кг - на 9,4 %, в группе Ф-100 мкг/кг - на 21,5 % ($p \leq 0,05$) и в группе Ф-200 мкг/кг - на 12,2 %. Длина тела животных (мм) уменьшается в группе контроля (МК) на 9,9 % ($p \leq 0,05$), в группе Ф-20 мкг/кг - на 4,9 %, в группе Ф-100 мкг/кг на 8,9 % ($p \leq 0,05$), в группе Ф-200 мкг/кг - на 8,4 % по сравнению с интактной группой. Длина «нос — ухо» (мм) уменьшается во всех исследуемых группах животных по сравнению с интактной группой: в контрольной группе (МК) на 7,4 %, в группе Ф-20 мкг/кг на 2,0 %, в группе Ф-100 мкг/кг на 8,1 % ($p \leq 0,05$) и в группе Ф-200 мкг/кг на 5,5 %.

В значениях длины «ухо — ухо» (мм) у исследуемых животных нет достоверных различий. Длина хвоста животных (мм) статистически значимо уменьшается в группе контроля (МК) на 7,9 % ($p \leq 0,05$) и в экспериментальной группе Ф-100 мкг/кг на 7,5 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. В показателе «длина стопы правой тазовой конечности» (мм) у исследуемых животных значимых различий не выявлено. Величина аногенитального расстояния (мм) потомства мужского пола лабораторных мышей при однократном воздействии препарата фулвестрант во всех исследуемых группах увеличивается по сравнению с интактной группой: Ф-20 мкг/кг на 35,4 % ($p \leq 0,05$), Ф-100 мкг/кг на 18,1 % ($p \leq 0,05$) и Ф-200 мкг/кг на 11,1 % ($p \leq 0,05$).

В результате исследования изменений аногенитального расстояния при пренатальном влиянии эстрогенов на потомство белых беспородных лабораторных мышей мужского пола и женского пола получены следующие данные. У потомства мужского пола в интактной группе масса тела составила $27,09 \pm 3,59$ г, в то время как в экспериментальной группе Ф-100 мкг/кг $21,23 \pm 1,69$ г и в группе С-50 мкг/кг $22,34 \pm 0,98$ г, разница между средними величинами интактной группы и экспериментальными группами составляет 5,86 и 4,75 г, соответственно. У потомства женского пола в интактной группе масса тела $20,50 \pm 2,14$ г, в то время как в экспериментальной группе Ф-100 мкг/кг составила $16,11 \pm 2,49$ г, разница между средними величинами равна 4,39 г. Незначительное уменьшение массы тела также наблюдали в экспериментальной группе С-50 мкг/кг по сравнению с интактной группой.

Воздействие синэстрола в дозе 50 мкг/кг у потомства белых беспородных лабораторных мышей мужского пола приводит к уменьшению аногенитального расстояния ($1,22 \pm 0,14$ мм) по сравнению с интактной группой ($1,44 \pm 0,09$ мм).

При воздействии высоких доз эстрогенов экспрессия к рецепторам эстрогенов теряется и демонстрируются «антиандрогенные эффекты». Эти эффекты можно считать онтогенетически отсроченными, феминизирующими. В экспериментальной группе Ф-100 наблюдали незначительное увеличение аногенитального расстояния ($1,70 \pm 0,07$ мм) по сравнению с интактной группой ($1,44 \pm 0,09$ мм). Фулвестрант в дозе 100 мкг/кг блокирует эстрогеновые рецепторы, в результате работают только андрогеновые, приводящие к повышению маскулинизирующего эффекта у потомства мужского пола.

2.2.3. Микроморфологические показатели яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синэстрола

В результате микроморфологических исследований срезов яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном воздействии синэстрола в экспериментальной группе С-25 мкг/кг (рисунок 1, 2), по сравнению с интактной группой, было установлено: уменьшение средней толщины покровного эпителия среза яичников по центру органа на 44,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади поперечного среза яичников на 18,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади коркового вещества среза яичников на 62,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней толщины коркового вещества среза яичников на 37,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение среднего диаметра кровеносных сосудов на стандартной площади среза яичников на 50,0 % ($p \leq 0,05$).

Анализ фолликулярного аппарата среза яичников на стандартной площади интактной и экспериментальной группы С-25 мкг/кг показал: снижение среднего количества примордиальных фолликулов на стандартной площади среза яичников на 72,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества первичных фолликулов на стандартной площади среза яичников на 54,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества вторичных на стандартной площади среза яичников на 39,0 %

($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади вторичных фолликулов на стандартной площади среза яичников на 37,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение средней площади третичных фолликулов на 48,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней теки, окружающей третичные фолликулы на 20,0% ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества атретических фолликулов на стандартной площади среза яичников на 62,0 % ($p \leq 0,05$).

Сравнительные морфометрические исследования среза яичников на стандартной площади интактной и экспериментальной группы С-25 мкг/кг показали: уменьшение среднего количества желтых тел на 48,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества лютеиновых клеток в желтом теле на стандартной площади на 46,0 % ($p \leq 0,05$).

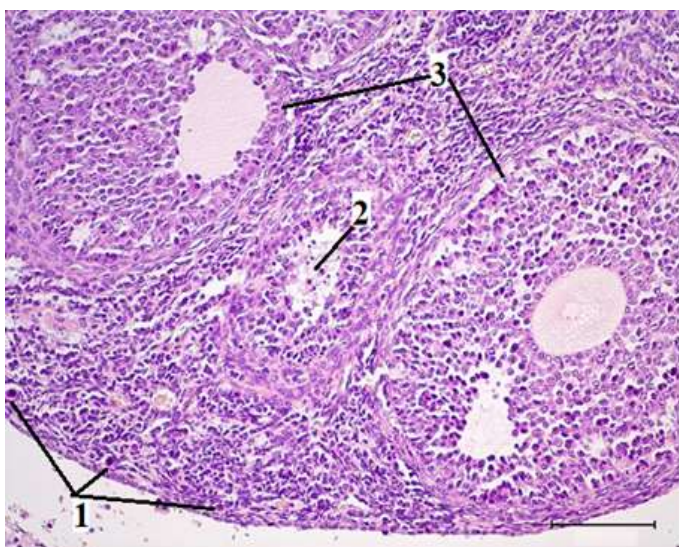


Рисунок 1 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-25 мкг/кг на 90-й день: 1 — примордиальные фолликулы; 2 — вторичный фолликул; 3 — третичные фолликулы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

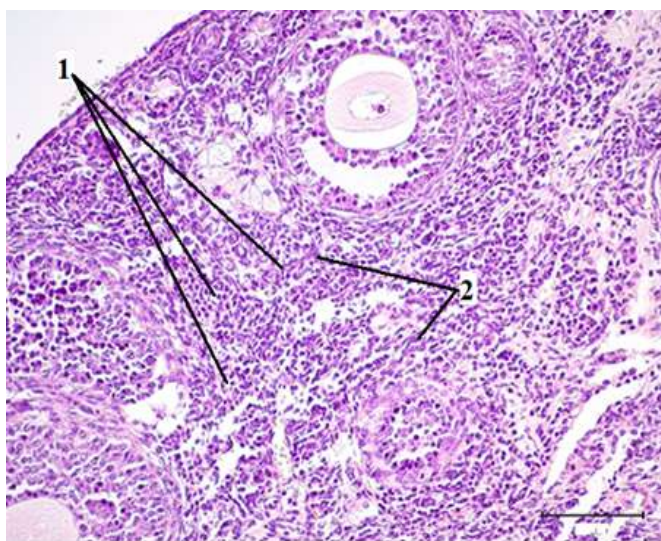


Рисунок 2 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-25 мкг/кг на 90-й день: 1 — рыхлая волокнистая соединительная ткань, 2 — кровеносные сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Анализ морфометрических показателей среза яичников по центру органа потомства лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном воздействии синэстрола в экспериментальной группе С-40 мкг/кг, по сравнению с интактной группой, показал: уменьшение средней толщины покровного эпителия среза яичников по центру органа на 41,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади поперечного среза яичников на 48,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади коркового вещества яичников на 73,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение средней толщины коркового вещества яичников на 22,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади мозгового вещества яичников и толщины на 74,0 % ($p \leq 0,05$) и 47,0 % ($p \leq 0,05$), соответственно; увеличение среднего диаметра кровеносных сосудов на стандартной площади среза яичников на 38,0 % ($p \leq 0,05$).

В результате морфометрических исследований установлено, что в экспериментальной группе С-40 мкг/кг (рисунок 3, 4), по сравнению с интактной, отмечалось: уменьшение среднего количества желтых тел в яичниках на 57,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади желтых тел в яичниках на 56,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества лютеиновых клеток в желтом теле на стандартной площади на 45,0 % ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ фолликулярного аппарата среза яичников на стандартной площади экспериментальной С-40 мкг/кг и интактной группы, показал: снижение среднего количества примордиальных фолликулов в яичниках на 86,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества первичных фолликулов в яичниках на 54,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества вторичных фолликулов на 48,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади вторичных фолликулов на 42,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества третичных фолликулов в яичниках на 47,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества атретических фолликулов в яичниках на 47,0 % ($p \leq 0,05$).

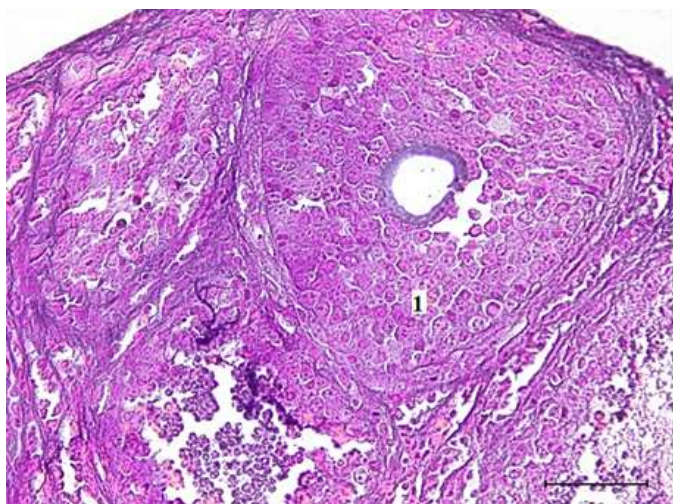


Рисунок 3 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-40 мкг/кг на 90-й день: 1 — третичный фолликул. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

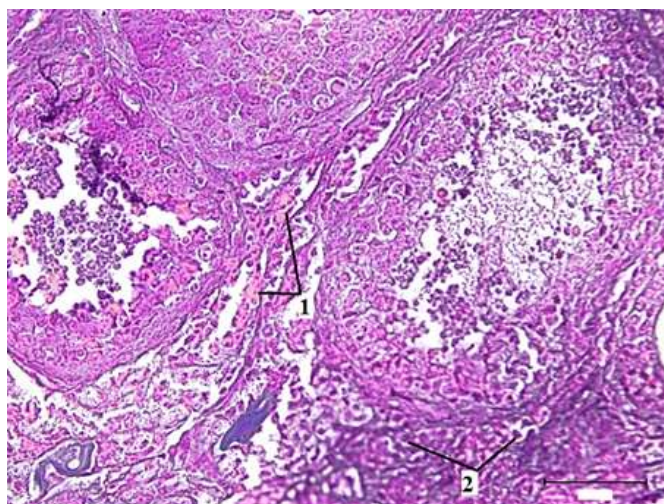


Рисунок 4 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-40 мкг/кг на 90-й день: 1 — кровеносные сосуды мозгового вещества; 2 — рыхлая волокнистая соединительная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

В литературе отсутствуют сведения о влиянии препарата с эстрогенной активностью синэстрола в дозе 50 мкг/кг. Анализ морфометрических показателей яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном воздействии синэстрола показал, что в экспериментальной группе животных С-50 мкг/кг (рисунок 5, 6), по сравнению с интактной группой, происходит: уменьшение средней толщины покровного эпителия яичников по центру органа в 3 раза ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади коркового вещества яичников на 39,0% ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади мозгового вещества яичников и толщины на 83,0 % ($p \leq 0,05$) и 17,0 %,

соответственно; увеличение среднего диаметра кровеносных сосудов на стандартной площади среза яичников на 94,0 % ($p \leq 0,05$). Структурно-функциональную зрелость яичника определяет показатель общего количества фолликулов с клеточным и популяционным составом. Анализ фолликулярного аппарата яичников показал, что в экспериментальной группе С-50 мкг/кг животных, по сравнению с интактной группой, происходит: снижение среднего количества примордиальных фолликулов в яичниках на 86,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение средней площади первичных фолликулов на 97,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества вторичных фолликулов на 36,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение средней площади вторичных фолликулов на 15,0 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества третичных фолликулов в яичниках на 34,0 % ($p \leq 0,05$). Морфометрические исследования показали, что в экспериментальной группе С-50 мкг/кг, по сравнению с интактной, отмечалось: увеличение среднего количества желтых тел в яичниках на 23,8 % ($p \leq 0,05$); снижение среднего количества лютеиновых клеток в желтом теле яичниках на 29,0 % ($p \leq 0,05$).

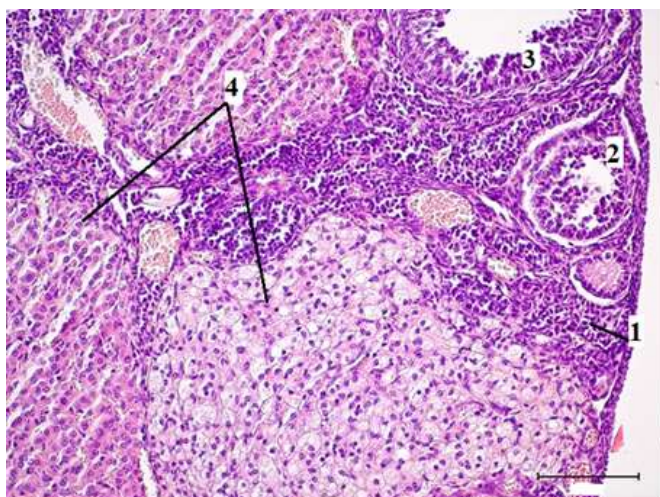


Рисунок 5 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-50 мкг/кг на 90-й день: 1 — первичный фолликул; 2 — вторичный фолликул; 3 — третичный фолликул; 4 — желтые тела. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

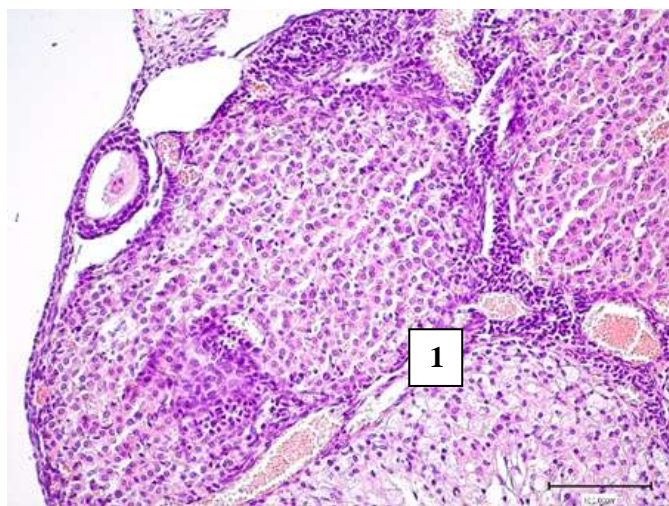


Рисунок 6 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-50 мкг/кг. на 90-й день 1 - увеличение диаметров магистральных сосудов в мозговом веществе. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

Таким образом, в результате морфологической оценки яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном воздействии синэстрола в разных дозах было установлено снижение числа примордиальных и растущих фолликулов по сравнению с животными интактной группы, свидетельствующее о нарушении репродуктивной функции у потомства. Результаты нашей работы согласуются с исследованиями Н. Н. Шевлюка, Е. В., Бокова, Л. Л. Дёминой (2008) и Л. Ф. Курило (2011) (Шевлюк Н. Н., Боков Е. В., Дёмина Л. Л., 2008; Курило Л. Ф., 2011; Baker T. G.,

1977), это обусловлено воздействием повреждающего фактора на яичник в целом и на фолликулы в разных стадиях их роста.

Известно, что овуляцию фолликула яичников, а также функциональную эффективность роста характеризует образование желтых тел. Экспериментальные исследования при воздействии доз 25 и 40 мкг/кг показали уменьшение количества образованных желтых тел, отражающее ослабление процесса овуляции, а введение препарата в дозе 50 мкг/кг продемонстрировало увеличение числа образованных желтых тел, что, возможно, указывает на увеличение количества созревающих фолликулов. В мозговом веществе наблюдается увеличение диаметра кровеносных сосудов, свидетельствующее об усилении кровоснабжения яичников потомства.

2.2.4. Микроморфологические показатели яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении фулвестранта

Анализ морфометрических показателей яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном воздействии фулвестранта показал, что в экспериментальной группе животных Ф-20 мкг/кг по сравнению с особями интактной группы отмечается увеличение среднего диаметра кровеносных сосудов на стандартной площади среза яичников на 38,0 % ($p \leq 0,05$).

Анализ фолликулярного аппарата яичников показал, что в экспериментальной группе животных Ф-20 мкг/кг (рисунок 7), по сравнению с контролем, происходит: значительное снижение среднего количества примордиальных фолликулов в яичниках на 81,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение среднего количества первичных фолликулов в яичниках в 2 раза ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади первичных фолликулов на 63,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение среднего количества вторичных фолликулов в 2 раза ($p \leq 0,05$); увеличение средней толщины теки, окружающей вторичные фолликулы на 19,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение среднего количества третичных фолликулов в яичниках в 2 раза ($p \leq 0,05$); увеличение средней толщины теки, окружающей третичные фолликулы, на 14,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение среднего количества атретических фолликулов в яичниках на 10,0 %.

Литературные данные по воздействию препарата фулвестрант в дозе 100 мкг/кг отсутствуют. В результате анализа морфометрических показателей яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей установлено, что в экспериментальной группе животных Ф-100 мкг/ (рисунок 8), по сравнению с интактной группой, происходило: уменьшение средней площади коркового вещества яичников на 51,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней толщины коркового вещества яичников на 36,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней площади мозгового вещества яичников на 61,0 % ($p \leq 0,05$); уменьшение средней толщины мозгового вещества яичников на 28,0 % ($p \leq 0,05$); увеличение среднего диаметра кровеносных сосудов на стандартной площади среза яичников на 38,0 % ($p \leq 0,05$).

Известно, что общее количество фолликулов, а также их клеточный популяционный состав являются важными показателями зрелости яичника. Анализ фолликулярного аппарата яичников показал, что в экспериментальной группе животных Ф-100 мкг/кг, по сравнению с контролем, происходило: снижение среднего количества примордиальных фолликулов в яичниках на 71,0% ($p \leq 0,05$); увеличение среднего количества вторичных фолликулов в 2 раза ($p \leq 0,05$).

Морфометрические исследования показали, что в экспериментальной группе животных Ф-100 мкг/кг, по сравнению с интактной, наблюдалось снижение среднего количества лютеиновых клеток в желтом теле на стандартной площади яичников на 47,0 % ($p \leq 0,05$).

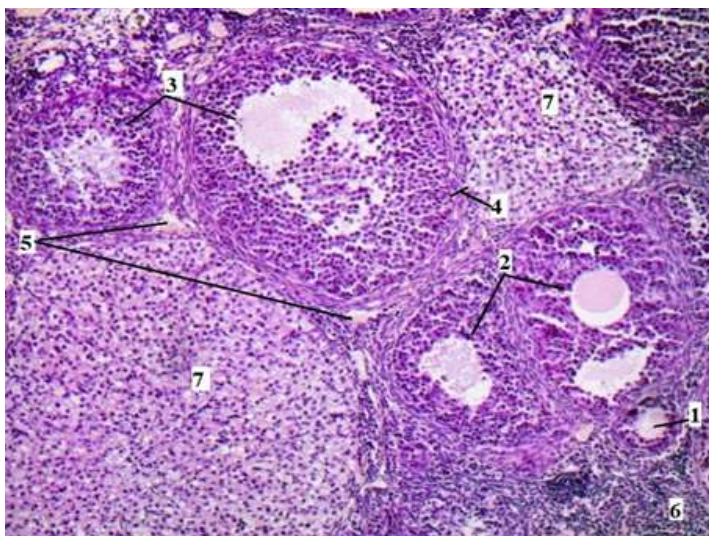


Рисунок 7 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы Ф-20 мкг/кг на 90-й день: 1 — первичные фолликулы (отмечается увеличение первичных фолликулов, внутренняя поверхность которых выстлана высоким цилиндрическим эпителием с зернистой цитоплазмой); 2 — вторичные фолликулы; 3 — третичные фолликулы; 4 — слой теки, окружающий фолликулы, утолщен. 5 — мозговое вещество; 6 — лимфоцитарная инфильтрация (определяется резко выраженное паретическое расширение сосудов и полнокровие как сосудов коркового вещества, так и мозгового); 7 — желтые тела. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

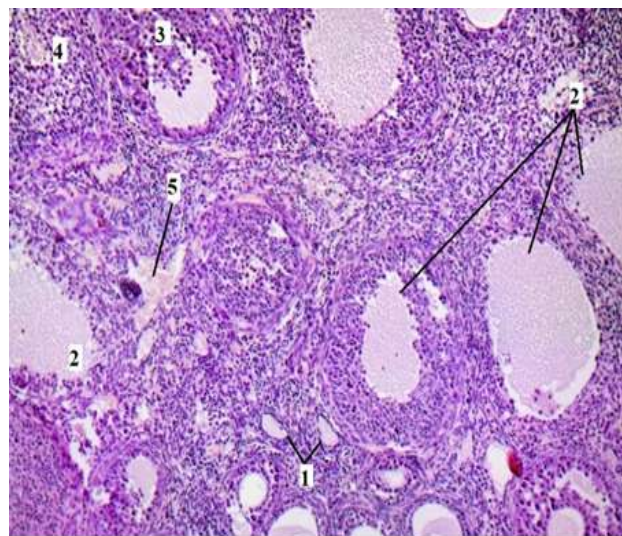


Рисунок 8 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы Ф-100 мкг/кг на 90-й день: 1 — первичные фолликулы (отмечаются увеличение первичных фолликулов и смещение их вглубь органа к мозговому веществу); 2 — вторичные фолликулы (также определяется выраженное преобладание вторичных фолликулов с признаками кистозного расширения, фолликулярный эпителий в них утолщен); 3 — третичные фолликулы; 4 — желтое тело; 5 — в мозговом слое отмечается обеднение кровотока сосудов. Окраса гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Таким образом, выявлено, что при однократном пренатальном внутримышечном воздействии фулвестранта на беременных самок мышей в разных дозах на срезе яичников потомства наблюдается снижение количества примордиальных, третичных фолликулов при одновременном увеличении среднего количества вторичных. Введение фулвестранта вызывало усиление

кровообращения яичников у потомства, на что указывало увеличение среднего диаметра кровеносных сосудов. Результаты наших экспериментальных исследований согласуются с результатами Н. А. Дуденкова, О. С. Шубина (2015), это обусловлено тем, что патогенное воздействие веществ различной природы является повреждающим фактором на репродуктивную систему в целом.

После проведенных микроморфологических исследований яичников потомства лабораторных мышей при однократном пренатальном внутримышечном введении фулвестранта в дозе 200 мкг/кг установлено, что корковое вещество и мозговое вещество плохо дифференцировано (рисунок 9, 10).

Наблюдалось значительное уменьшение примордиальных фолликулов, сохраненные фолликулы на срезе имели признаки атрофии и дистрофии.

Структура вторичных, третичных фолликулов и желтых тел не просматривалась, наблюдались кистозные изменения.

Площадь яичника представлена большим количеством полостей, выстланных однослойным, резко уплощенным эпителием, с признаками повреждений, сопровождающихся некрозом клеток, полнокровием и очаговым фибриноидным некрозом сосудов коркового и мозгового вещества. Слой теки расширен за счет выраженного фиброза и отека.

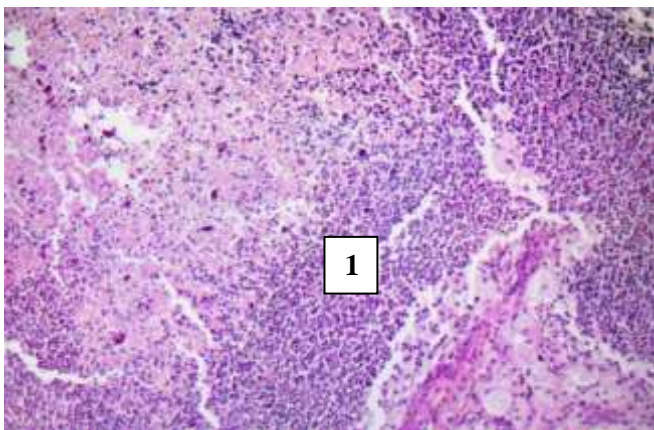


Рисунок 9 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы Ф-200 мкг/кг на 90-й день: 1 - тотальный некроз, нейтрофильная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

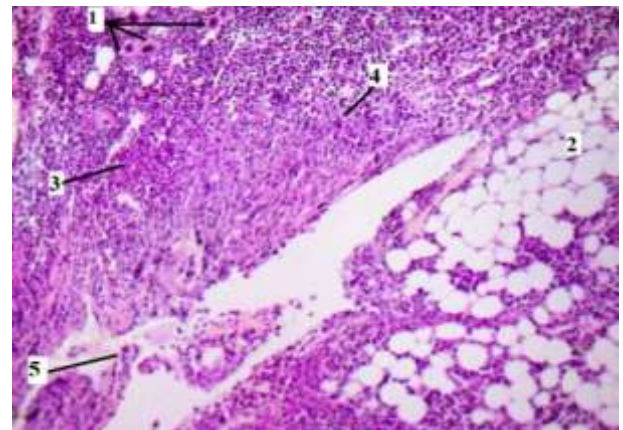


Рисунок 10 — Яичник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы Ф-200 мкг/кг на 90-й день: 1 — вторичные фолликулы (присутствуют кистозные изменения); структуры третичных фолликулов и желтых тел не определяются; 2 — жировая ткань; 3, 4 — некроз стромальных клеток; 5 — умеренное полнокровие сосудов с очаговым фибриноидным некрозом сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Гистологический анализ яичников потомства лабораторных мышей при однократном пренатальном внутримышечном введении препарата фулвестрант в дозе 200 мкг/кг выявил патоморфологические изменения в корковом и мозговом

веществе. Микроскопически не определялись части коркового и мозгового вещества органа и не поддавались дифференцировке. Наблюдалось значительное уменьшение фолликулов на всех стадиях развития, сохраненные фолликулы встречались с признаками атрофии и дистрофии.

Выявленная в результате исследований гистологическая картина в яичниках потомства при однократном пренатальном внутримышечном введении препарата фулвестрант в дозе 200 мкг/кг не подлежала морфометрическим измерениям.

2.2.5. Иммуногистохимические исследования яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синэстрола и фулвестранта

2.2.5.1. Исследование иммуногистохимического маркера Vcl-2

В результате морфометрического анализа ИГХ- маркера Vcl-2 при введении эстрогенного препарата синэстрол установлено, что количество позитивно окрашенных клеток в первичном фолликуле яичника статистически значимо увеличилось в группе контроля (МО) на 18,7 % ($p \leq 0,05$), в группе С-25 мкг/кг на 24,4 % ($p \leq 0,05$) и в группе С-50 мкг/кг (рисунок 11) на 26,3 % ($p \leq 0,05$), а в группе С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение (на 12,9 %, $p \leq 0,05$) этого же показателя по сравнению с интактной группой. Анализ показал, что при введении фулвестранта в группе контроля (МК) и в группе Ф-20 мкг/кг по сравнению с интактной группой значимые различия отсутствовали. Статистически значимое различие выявлено только в группе Ф-100 мкг/кг (рисунок 12), и по сравнению с интактной группой позитивно окрашенные клетки в данной группе увеличились на 24,0 % ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ с интактной группой показал, что количество позитивно окрашенных клеток во вторичном фолликуле яичника в группе контроля (МО) и в группе С-40 мкг/кг увеличились на 10,4 и 5,8 %, соответственно, но статистически значимых различий не отмечены. Количество позитивно окрашенных клеток уменьшилось в группах С-25 мкг/кг и С-50 мкг/кг по сравнению с интактной группой на 18,7 % ($p \leq 0,05$) и 42,2 % ($p \leq 0,05$), соответственно. Также, уменьшение позитивно окрашенных клеток произошло в группе контроля (МК) на 13,1 % ($p \leq 0,05$) и в группе Ф-20 мкг/кг на 13,7 % по сравнению с интактной группой. В группе Ф-100 мкг/кг произошло увеличение количества позитивно окрашенных клеток на 21,1 % по сравнению с интактной группой, но эти различия не были статистически значимыми.

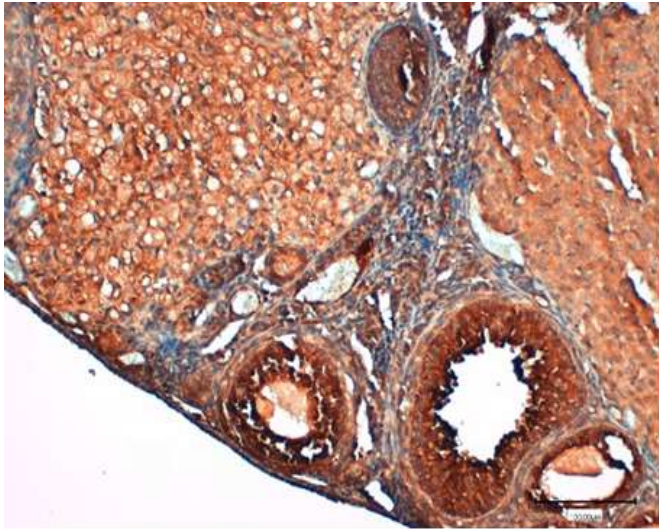


Рисунок 11 — Vcl-2+ маркер в яичнике потомства белой беспородной лабораторной мыши при воздействии синэстрола в дозе 50 мкг/кг на 90-й день. ИГХ-реакция на маркер Vcl-2. Докраска ядер гематоксилином. x100.

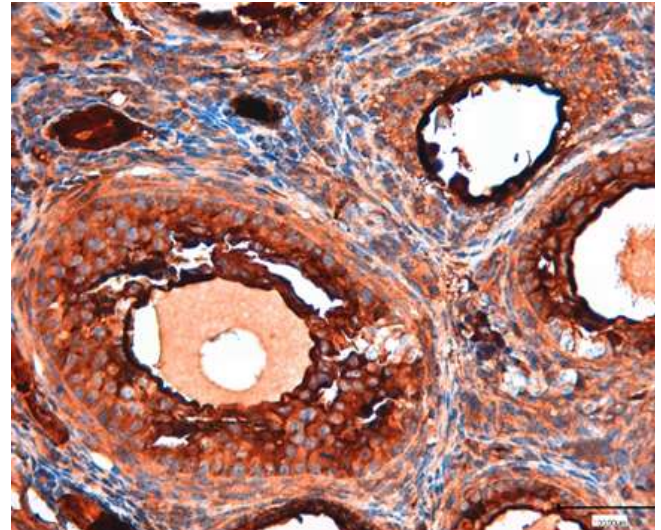


Рисунок 12 — Vcl-2+ маркер в яичнике потомства белой беспородной лабораторной мыши при воздействии фулвестранта в дозе 100 мкг/кг на 90-й день. ИГХ-реакция на маркер Vcl-2. Докраска ядер гематоксилином. x100.

Морфометрический анализ ИГХ-маркера Vcl-2 при введении различных доз эстрогенов в результате показал, что количество позитивно окрашенных клеток в третичном фолликуле яичника увеличилось в группе С-25 мкг/кг на 35,4 % ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг - на 32,5 % ($p \leq 0,05$) и в группе Ф-20 мкг/кг - на 31,8 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. По сравнению с интактной группой незначительное увеличение позитивно окрашенных клеток произошло в группе С-50 мкг/кг (на 6,1 %), группе контроля (МК - на 5,4 %) и в группе Ф-100 мкг/кг (на 7,1 %).

В ходе морфометрического анализа ИГХ-маркера Vcl-2 при введении различных доз эстрогенов было установлено, что количество позитивно окрашенных клеток в желтом теле яичника увеличилось в группе С-25 мкг/кг на 12,4 % ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг - на 16,5 % ($p \leq 0,05$) и в группе Ф-100 мкг/кг - на 15,5 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. В экспериментальных группах контроля (МО) и Ф-20 мкг/кг произошло незначительное увеличение позитивно окрашенных клеток по сравнению с интактной группой на 0,3 и 1,6 % соответственно. По сравнению с интактной группой произошло снижение количества позитивно окрашенных клеток в группе С-50 мкг/кг на 1,9 %, группе контроля (МК) – на 26,1% ($p \leq 0,05$).

Результаты проведенного нами анализа показали, что количество позитивно окрашенных клеток в строме яичника статистически значимо уменьшилось в группе контроля (МО) на 11,9 % ($p \leq 0,05$), в группе С-40 мкг/кг – на 16,9 % ($p \leq 0,05$), в группе С-50 мкг – на 52,2 % ($p \leq 0,05$), в группе контроля (МК) на 13,9% ($p \leq 0,05$), в группе Ф-20 мкг/кг – на 21,1 % ($p \leq 0,05$) и в группе Ф-100 мкг/кг - на 9,7 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой.

2.2.5.2 Исследование иммуногистохимического маркера Ki-67

В результате морфометрического анализа ИГХ-маркера Ki-67 при введении доз эстрогенов определили, что количество позитивно окрашенных клеток в первичном фолликуле яичника по сравнению с интактной группой уменьшилось в таких группах, как группа контроля (МО) на 8,2 %, группа С-25 мкг/кг на 16,7 % ($p \leq 0,05$), группа контроля (МК) на 5,5 %, группа Ф-20 мкг/кг (рисунок 13) на 11,7% ($p \leq 0,05$) и группа Ф-100 мкг/кг (рисунок 14) на 17,5 % ($p \leq 0,05$). Увеличение количества позитивно окрашенных клеток произошло в группах С-40 мкг/кг на 0,9 % и С-50 мкг/кг на 13,5 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой.

Морфометрический анализ ИГХ-маркера Ki-67 при введении различных доз эстрогенов в результате показал, что количество позитивно окрашенных клеток во вторичном фолликуле яичника произошло в группе контроля (МО) на 2,9 %, в группах С-40 мкг/кг – на 11,1 %, С-50 мкг/кг – на 13,5 %, Ф-100 мкг/кг – на 9,2 %. В экспериментальной группе Ф-20 мкг/кг значимых различий не было по сравнению с интактной группой. Уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в рассматриваемом фолликуле произошло только в экспериментальной группе С-25мкг/кг на 4,6 % по сравнению с интактной группой.

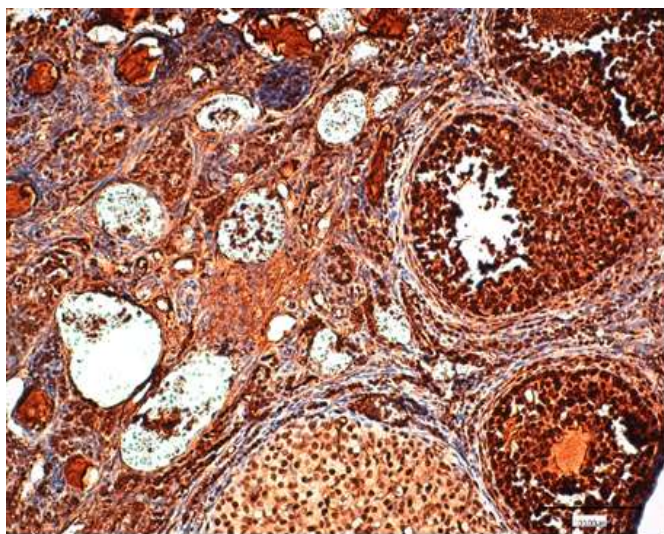


Рисунок 13 — Ki-67+ маркер в яичнике потомства белой беспородной лабораторной мыши при воздействии фулвестранта в дозе 20 мкг/кг на 90-й день. ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Продукт реакции коричневого цвета. Докраска ядер гематоксилином. x100.

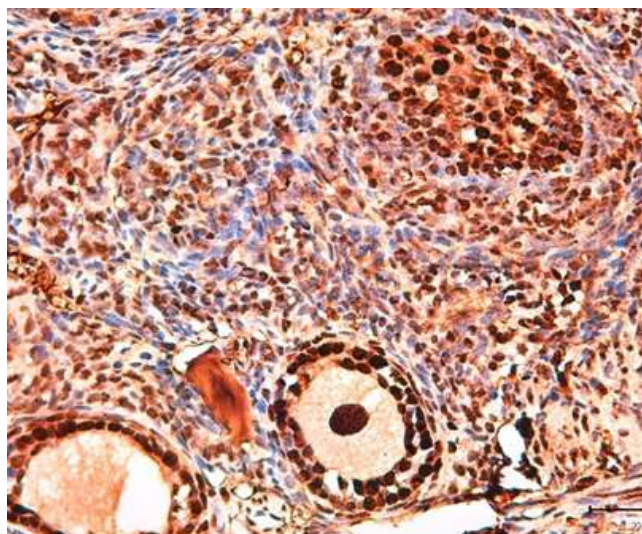


Рисунок 14 — Ki-67+ маркер в яичнике потомства белой беспородной лабораторной мыши при воздействии фулвестранта в дозе 100 мкг/кг на 90-й день. ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Продукт реакции коричневого цвета. Докраска ядер гематоксилином. x100.

Сравнительный анализ с интактной группой показал, что количество позитивно окрашенных клеток в третичном фолликуле яичника уменьшилось в контрольной группе (МО) на 11,6 % ($p \leq 0,05$), в группе С-25 мкг/кг – на 22,0 % ($p \leq 0,05$), в группе контроля (МК) – на 8,9 % и в группа Ф-100 мкг/кг – на 5,8 %. Статистически значимое увеличение количества позитивно окрашенных клеток произошло в таких группах, как С-40 мкг/кг на 7,6 % и С-50 мкг/кг – на 10,1 %. В

экспериментальной группе Ф-20 мкг/кг значимых различий не было по сравнению с интактной группой.

В ходе морфометрического анализа ИГХ-маркера Ki-67 при введении различных доз эстрогенов было установлено, что количество позитивно окрашенных клеток в желтом теле яичника увеличилось в таких группах, как контрольная группа (МО) на 14,4 % ($p \leq 0,05$), группа С-25 мкг/кг – на 1,3 %, группа С-50 мкг/кг – на 35,1 % ($p \leq 0,05$), группа контроля (МК) – на 11,0 % и группа Ф-100 мкг/кг – на 3,7 % по сравнению с интактной группой. Уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в желтом теле произошло только в экспериментальной группе С-40 мкг/кг и Ф-20 мкг/кг на 26,1 % ($p \leq 0,05$) и на 3,3%, соответственно, по сравнению с интактной группой.

Результаты проведенного анализа показали, что количество позитивно окрашенных клеток в строме яичника по сравнению с интактной группой увеличилось в группе контроля (МО) на 8,6 %, в группах С-40 мкг/кг – на 37,5 % ($p \leq 0,05$), С-50 мкг/кг – на 14,6 % ($p \leq 0,05$), в контрольной группе – (МК) на 13,2 % ($p \leq 0,05$), Ф-20 мкг/кг – на 12,1 % ($p \leq 0,05$) и Ф-100 мкг/кг – на 17,8 % ($p \leq 0,05$).

2.2.5.3. Исследование иммуногистохимического маркера p53

Морфометрический анализ ИГХ-маркера p53 при введении различных доз эстрогенов показал, что количество позитивно окрашенных клеток в первичном фолликуле яичника по сравнению с интактной группой увеличилось в контрольной группе (МО) на 10,4 %, в группах С-25 мкг/кг – на 10,0 % и С-40 мкг/кг (рисунок 15) – на 4,0%. Уменьшение количества позитивно окрашенных клеток произошло в группе С-50 мкг/кг на 12,1 %, в контрольной группе (МК) – на 0,7 %, в группах Ф-20 мкг/кг – на 12,1 % и Ф-100 мкг/кг (рисунок 16) – на 5,4 %, по сравнению с интактной группой.

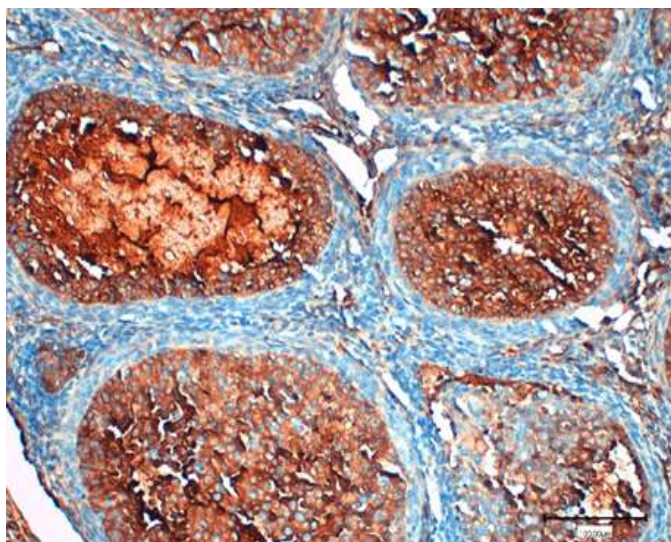


Рисунок 15 — p53+ маркер в яичнике потомства на белой беспородной лабораторной мыши при воздействии синэстрола в дозе 40 мкг/кг на 90-й день. ИГХ-реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. x100.

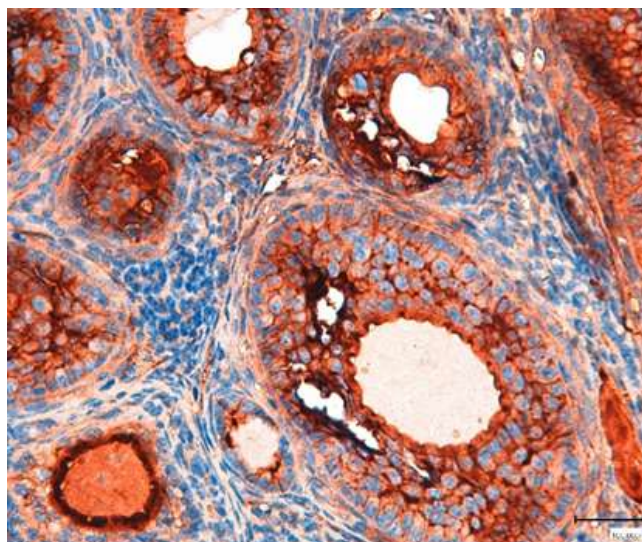


Рисунок 16 — p53+ маркер в яичнике потомства белой беспородной лабораторной мыши при воздействии фулвестранта в дозе 100 мкг/кг. на 90-й день. ИГХ-реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. x100.

Сравнительный анализ с интактной группой продемонстрировал, что количество позитивно окрашенных клеток во вторичном фолликуле яичника увеличилось в группе контроля (МО) на 3,1 % и в группе Ф-20 мкг/кг – на 0,3 %. По сравнению с интактной группой произошло уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в группах С-25 мкг/кг на 3,8 %, С-40 мкг/кг – на 4,4 %, С-50 мкг/кг – на 0,9 %, в контрольной группе (МК) – на 10,9 %, в группе Ф-100 мкг/кг – на 9,4 %.

Морфометрический анализ ИГХ-маркера p53 при введении различных доз эстрогенов показал, что количество позитивно окрашенных клеток в третичном фолликуле яичника по сравнению с интактной группой увеличилось в контрольной группе (МО) на 5,1 %, в группах С-25 мкг/кг – на 8,1 %, С-40 мкг/кг – на 22,0 % ($p < 0,05$), С-50 мкг/кг – на 14,9 % и Ф-20 мкг/кг – на 6,4 %. По сравнению с интактной группой произошло уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в таких группах, как группа контроля (МК) на 2,0 % и группа Ф-100 мкг/кг – на 3,4%.

В ходе морфометрического анализа ИГХ-маркера p53 при введении различных доз эстрогенов было установлено, что количество позитивно окрашенных клеток в желтом теле яичника уменьшилось по сравнению с интактной группой в таких группах, как группа контроля (МО) – на 3,8 %, С-40 мкг/кг – на 22,8 % ($p \leq 0,05$), контрольная группа (МК) – на 9,6 % и Ф-100 мкг/кг – на 15,1 %. По сравнению с интактной группой произошло увеличение количества позитивно окрашенных клеток в группах С-25 мкг/кг – на 8,7 %, С-50 мкг/кг – на 9,9 % и Ф-20 мкг/кг – на 24,0% ($p \leq 0,05$).

Результаты проведенного анализа показали, что количество позитивно окрашенных клеток в строме яичника по сравнению с интактной группой увеличилось в таких группах, как группа контроля (МО) – на 11,5 %, С-25 мкг/кг – на 9,0 % ($p < 0,05$), С-50 мкг/кг – на 20,5 %, контрольная группа (МК) – на 4,5 %. По сравнению с интактной группой произошло уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в группах С-40 мкг/кг – на 0,3 %, Ф-20 мкг/кг – на 10,4 % и Ф-100 мкг/кг – на 6,3 %.

2.2.6. Микроморфологические изменения в семенниках потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синэстрола

Морфометрический анализ показателей извитых семенных канальцев потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синтетического препарата синэстрола показал отсутствие значимых различий количества извитых семенных канальцев в одном поле зрения в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг по сравнению с интактной группой (рисунки 17, 18). В показателе площади поперечного сечения извитого семенного канальца незначительное уменьшение произошло только в группе С-25 мкг/кг по сравнению с интактной группой. Диаметры извитых семенных канальцев в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг незначительно уменьшились, но значимых различий по

сравнению с данными интактной группы не выявлено. Толщина сперматогенного эпителия незначительно увеличилась в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества sustentocитов в эпителии извитого семенного канальца на 11,3 % ($p \leq 0,05$) и 16,3% ($p \leq 0,05$) соответственно.

Значимое уменьшение количества сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца произошло в экспериментальной группе С-40 мкг/кг на 7,6 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Показатель количества сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца незначительно уменьшился в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг, но значимых различий не показал по сравнению с интактной группой. В количестве сперматид в эпителии извитого семенного канальца значимых различий не отмечено. Сравнительный анализ по количеству сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца животных экспериментальных групп С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг с данными животных интактной группы показал, что произошло статистически значимое уменьшение этого параметра на 10,9 % ($p \leq 0,05$) и 9,5 % ($p \leq 0,05$) соответственно. Уменьшение площади ядер интерстициальных клеток наблюдалось экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг по сравнению с интактной группой на 12,5 % и 26,6 % ($p \leq 0,05$) соответственно.



Рисунок 17 — Семенник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-25 мкг/кг на 90-й день: 1 — базальная мембрана; 2 — сперматогенный эпителий; 3 — сперматогонии; 4 — сперматоциты; 5 — сперматиды; 6 — сперматозоиды; 7 — кровеносные сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

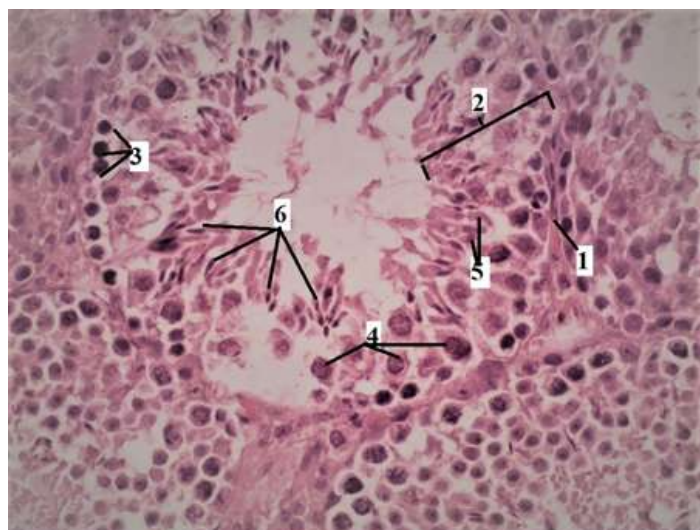


Рисунок 18 — Семенник потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-40 мкг/кг на 90-й день: 1 — базальная мембрана; 2 — сперматогенный эпителий; 3 — сперматогонии; 4 — сперматоциты; 5 — сперматиды; 6 — сперматозоиды. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Таким образом, в ходе анализа морфофункционального состояния семенников потомства половозрелых самцов, матерям которых во время беременности вводили синтетический аналог эстрогена синэстрол в дозе 25 мкг/кг

и в дозе 40 мкг/кг, выявлена морфофункциональная перестройка стромальных компонентов исследуемых структур, которые проявляются в виде уменьшения их средних показателей. Эти изменения представляют собой достоверные критерии, отражающие патологические структурно-функциональные изменения в семенниках потомства в виде снижения продукции половых клеток в просвете канальца, а также угнетения регуляции интенсивности процессов сперматогенеза.

2.2.7. Иммуногистохимические исследования семенников потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном однократном внутримышечном введении синэстрола

Иммуногистохимический анализ маркера Vcl-2 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг показал (рисунок 19, 20), что количество клеток, позитивно окрашенных сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца увеличилось на 8,6 и 9,4 % по сравнению с интактной группой.

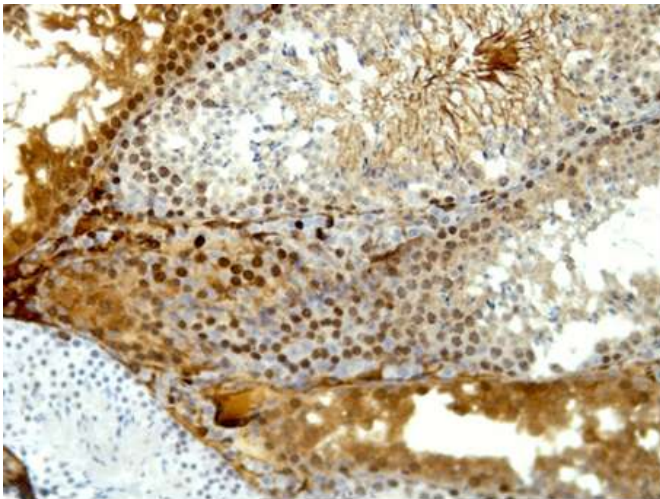


Рисунок 19 — Vcl-2⁺ маркер в семеннике потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-25 мкг/кг. на 90-й день ИГХ-реакция на маркер Vcl-2. Докраска ядер гематоксилином. x100.

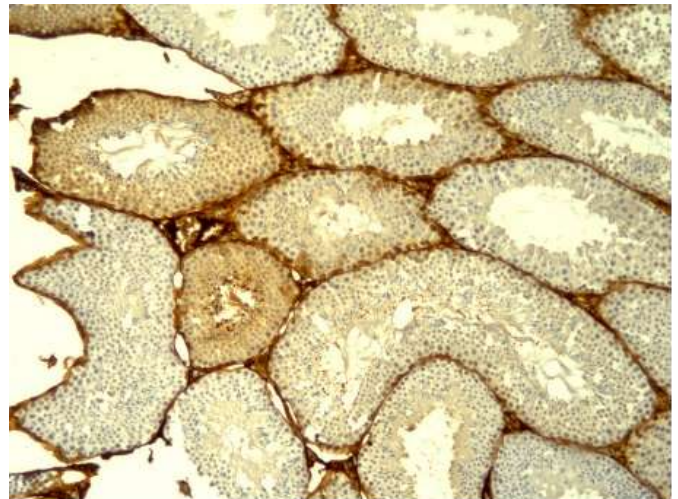


Рисунок 20 — Vcl-2⁺ маркер в семеннике потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-40 мкг/кг. на 90-й день ИГХ-реакция на маркер Vcl-2. Докраска ядер гематоксилином. x100.

Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг в клетках сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца различий не выявил. Количество позитивно окрашенных клеток сперматидов в эпителии извитых семенных канальцев экспериментальных групп незначительно увеличилось по сравнению с интактной группой. Сравнительный анализ данных интактной группы с результатами экспериментальных групп С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг по количеству сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца различий не показал. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг произошло статистически значимое уменьшение количества позитивно окрашенных интерстициальных клеток в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами на 56,0%

($p \leq 0,05$) и 60,0 % ($p \leq 0,05$), соответственно. В результате морфометрического анализа ИГХ-маркера Ki-67 при введении животным экспериментальных групп синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг (рисунок 21, 22), было установлено, что количество позитивно окрашенных клеток в их сперматогониях по сравнению с данным показателем интактной группы значимых различий не имело.

Сравнительный анализ количества позитивно выявляемых сперматоцитов эпителия извитого семенного канальца у животных экспериментальных групп С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг с данными животных интактной группы различий не выявил. Количество позитивно окрашенных клеток сперматидов в эпителии извитого семенного канальца в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг увеличилось по сравнению с интактной группой на 11,3 % ($p \leq 0,05$) и 4,1%, соответственно. Сравнительный анализ интактной группы с экспериментальными группами С-25 и С-40 мкг/кг по количеству сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца различий не показал. Сравнительный анализ количества интерстициальных клеток в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами у животных экспериментальных групп С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг с данными животных интактной группы продемонстрировал статистически значимое уменьшение на 52,0% ($p \leq 0,05$) и 48,0 % ($p \leq 0,05$), соответственно.

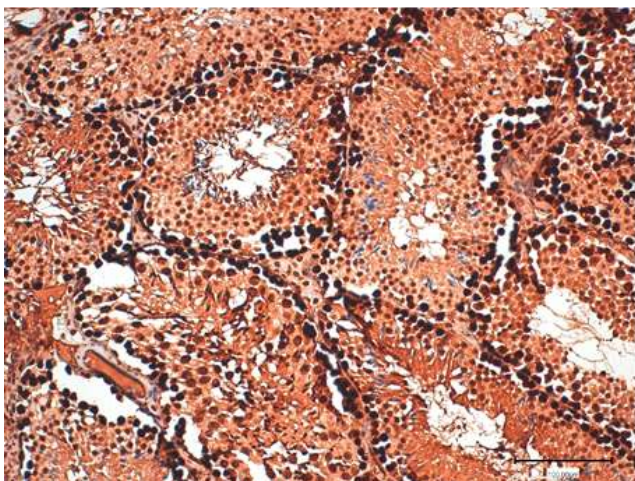


Рисунок 21 — Ki-67⁺ маркер в семеннике потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-25 мкг/кг. на 90-й день ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. x100.

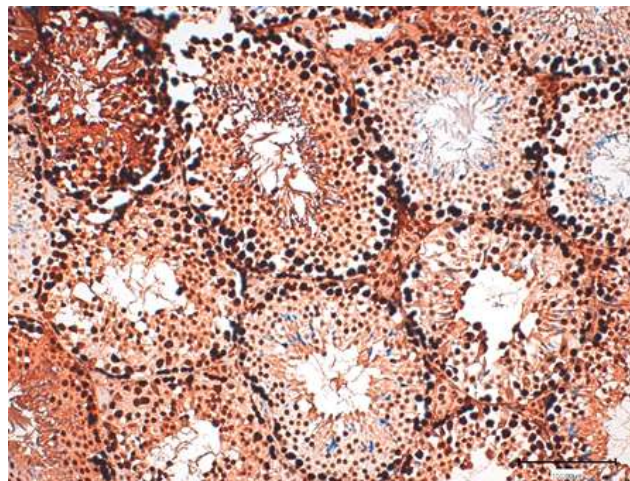


Рисунок 22 — Ki-67⁺ маркер в семеннике потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-40 мкг/кг. на 90-й день ИГХ-реакция на маркер Ki-67. Докраска ядер гематоксилином. x100.

Морфометрический анализ ИГХ-маркера p53 при введении синтетического препарата синэстрол в дозах 25 и 40 мкг/кг показал незначительное увеличение количества позитивно окрашенных клеток в сперматогониях по сравнению с интактной группой. Сравнительный анализ данных интактной группы с результатами экспериментальных групп С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг (рисунок 23, 24) в клетках сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца различий не показал.

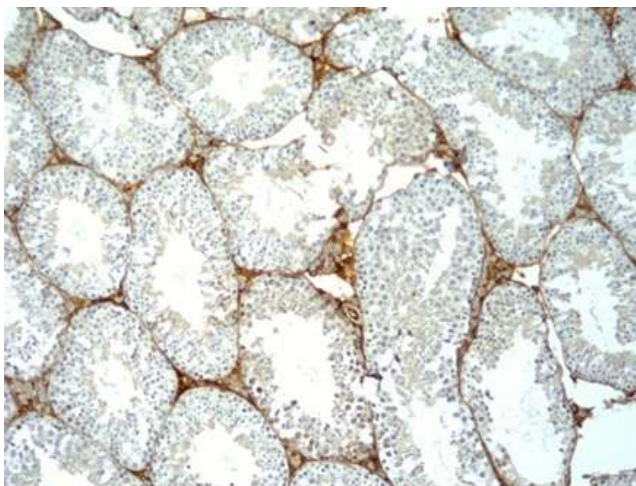


Рисунок 23 — p53⁺ маркер в семеннике потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-25 мкг/кг. на 90-й день ИГХ-реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. x100.

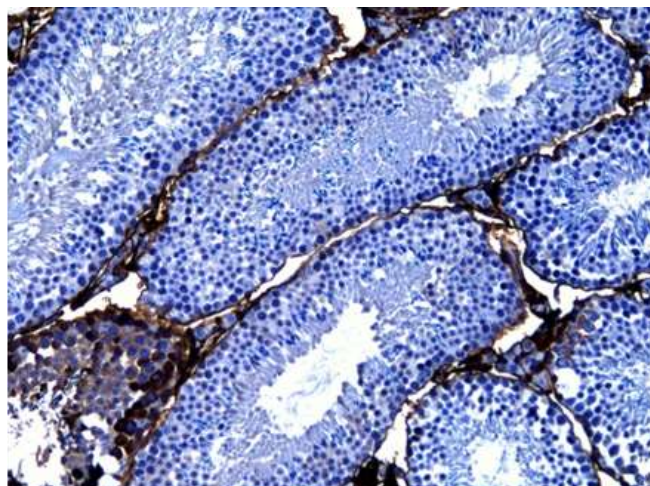


Рисунок 24 — p53⁺ маркер в семеннике потомства белой беспородной лабораторной мыши экспериментальной группы С-40 мкг/кг. на 90-й день ИГХ-реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. x100.

Сравнительный анализ количества позитивно окрашенных клеток сперматидов в эпителии извитого семенного канальца в экспериментальных группах С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг значимых различий не показал по сравнению с интактной группой. Анализ количества сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца в интактной группе по сравнению с экспериментальными группами С-25 и С-40 мкг/кг различий не показал. Сравнительный анализ количества интерстициальных клеток в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами животных экспериментальных групп С-25 мкг/кг и С-40 мкг/кг с данными интактной группы выявил статистически значимое уменьшение на 61,1 % ($p \leq 0,05$) и 74,1 % ($p \leq 0,05$) соответственно.

3. ЗАЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментального комплексного исследования разработаны и запатентованы две модели возможных отдаленных повреждений в яичниках и семенниках потомства при введении в материнский организм в период беременности (стадия E11.5) препаратов эстрогенового и антиэстрогенового рядов, что необходимо учитывать в научно-практической деятельности специалистов биологического профиля при воспроизводстве высокопродуктивных и исчезающих видов животных.

Исследованиями показано, что у потомства в раннем постнатальном онтогенезе наблюдаются достоверные отличия в параметрах соматометрических показателей по сравнению с данными интактной группы. Внутриутробное воздействие эстрогенных препаратов не влияет на массу тела потомства, приводит к изменению аногенитального расстояния и не зависит от половой принадлежности потомства.

Представленные данные свидетельствуют о том, что введение веществ с эстрогенной и антиэстрогенной активностью приводит к различным патологическим нарушениям в структурной организации яичников и семенников.

При этом установлено, что органы репродуктивной системы потомства мужского пола на структурном уровне подвержены изменениям в меньшей степени, чем у женского пола.

Впервые при исследовании экспрессии маркеров пролиферации (Ki-67), ингибитора апоптоза (Bcl-2) и индуктора апоптоза (p53) в яичниках и семенниках потомства, на фоне применения различных доз препаратов эстрогенового (синэстрол) и антиэстрогенового (фулвестрант) рядов беременным матерям, выявлены повреждения, визуализируемые в виде пролиферативных процессов, апоптической гибели клеток и других деструктивных нарушений в эндокринном аппарате.

Представленное диссертационное исследование способствует решению научной проблемы в области биологии и зооветеринарной практике по прогнозированию, разработке мер профилактики возможных функциональных отклонений и возникновения повреждений в органах репродуктивной системы у потомства, при разработке вспомогательных репродуктивных технологий с целью повышения эффективности использования генетических ресурсов и сохранения генофонда высокопродуктивных и исчезающих видов животных.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны, апробированы и запатентованы две экспериментальные модели, позволяющие прогнозировать возможные отдаленные повреждения в гонадах потомства, полученного от матерей, которым вводили препараты эстрогенового и антиэстрогенового рядов в период беременности (стадия E11.5).

2. Эквивалентные дозы препаратов эстрогенового (синэстрол - 40 мкг/кг) и антиэстрогенового (фулвестрант - 100 мкг/кг) рядов беременным самкам (стадия E11.5) приводят к деструктивным процессам в гонадах их потомства.

3. Введение синэстрола беременным матерям в дозе 50 мкг/кг приводит к изменению соматометрических показателей у потомства мужского пола: увеличивается длина «ухо-ухо» на 41,0 %, длина стопы правой тазовой конечности на 23,0 %, уменьшается на 15,0 % аногенитальное расстояние. Введение фулвестранта беременным матерям в дозе 100 мкг/кг приводит к увеличению на 18,0 % аногенитального расстояния у потомства по сравнению с параметрами интактной группы

4. У потомства женского пола, матерям которых вводили во время беременности синэстрол в дозе 50 мкг/кг, наблюдается увеличение длины «ухо-ухо» на 38,0 %, длины стопы правой тазовой конечности на 25,0 %, уменьшение на 22,0 % аногенитального расстояния по сравнению с данными интактной группы. При введении фулвестранта в дозе 200 мкг/кг регистрируется увеличение длины «ухо-ухо» на 52,0 %, без достоверного изменения параметров аногенитального расстояния.

5. Введение беременным самкам (стадия E11.5) синэстрола в дозе 50 мкг/кг приводит к значительным микроморфологическим изменениям в яичниках потомства: снижается на 86,0 % среднее количество примордиальных фолликулов, увеличивается на 23,8 % среднее количество желтых тел, и

уменьшается на 29,0% среднее количество лютеиновых клеток. В мозговом веществе отмечается увеличение в 2 раза диаметра сосудов микроциркуляторного русла, что свидетельствует об усилении кровоснабжения органа. Применение фулвестранта в дозе 100 мкг/кг приводит к снижению среднего количества примордиальных, третичных фолликулов при одновременном увеличении в 2 раза вторичных, на 76,0 % увеличивается среднее количество атретических фолликулов.

6. Инъекция беременным самкам (стадия E11.5) синэстрола в дозах 25 и 40 мкг/кг вызывает достоверное уменьшение среднего количества суспендоцитов на 11,3 % и 16,3 % соответственно, значений площади ядер интерстициальных клеток на 12,5 % и 26,6 % соответственно в семенниках потомства белых беспородных лабораторных мышей по сравнению с данными интактной группы.

7. Экспрессия маркера пролиферации (Ki-67), ингибитора апоптоза (Bcl-2) и индуктора апоптоза (p53) в яичниках потомства при введении беременным самкам (стадия E11.5) синэстрола в дозах 40 мкг/кг и 50 мкг/кг приводит к снижению митотической активности и увеличению числа апоптозных клеток. Использование фулвестранта в дозе 100 мкг/кг вызывает увеличение среднего количества позитивно окрашенных клеток к Ki-67 и Bcl-2 в яичниках потомства, что свидетельствует о повышении митотической активности клеток.

8. Экспрессия маркеров Ki-67, Bcl-2 и p53 в интерстициальных (эндокринных) клетках семенников потомства, полученного от матерей, которым вводили во время беременности (стадия E11.5) синэстрол в дозах 25 мкг/кг и 40 мкг/кг приводит к замедлению процессов пролиферации и апоптоза. Количество позитивно окрашенных клеток к маркеру Ki-67 снизилось на 52,0 % и на 48,0 % соответственно, к маркеру Bcl-2 уменьшилось на 56,0 % и на 60,0 % соответственно, а к маркеру p53 снизилось на 61,1 % и на 74,1 % по сравнению с данными интактной группы.

Практические предложения

Разработанные и запатентованные модели (№ RU2676437, № RU2722988) рекомендуется использовать в научно-практической деятельности биологов и зооветеринарных специалистов с целью контролируемого моделирования пренатального воздействия, прогнозирования и профилактики возможных функциональных нарушений и развития патологических процессов в органах репродуктивной системы потомства, при воспроизводстве высокопродуктивных и исчезающих видов животных.

Данные по соматометрическим параметрам органов, морфологическим, морфометрическим и иммуногистохимическим показателям тканей и клеток семенников и яичников потомства белых беспородных лабораторных мышей, могут быть использованы в качестве референсных в оценке их функционального состояния при моделировании патоморфологических процессов.

Результаты экспериментальных исследований могут быть использованы при проведении научных исследований, составлении монографий, учебно-методических пособий и справочных материалов по гистологии, эмбриологии и

цитологии, физиологии, патофизиологии, фармакологии, репродуктологии, эндокринологии, акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных, при подготовке специалистов в учебных заведениях биологического профиля.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенные экспериментальные исследования позволили получить новые фундаментальные данные по динамике соматометрических, морфометрических, морфологических и иммуногистохимических показателей органов репродуктивной системы потомства белых беспородных лабораторных мышей. Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку мер профилактики возможных функциональных отклонений и возникновения повреждений в органах репродуктивной системы у потомства при воспроизводстве высокопродуктивных и исчезающих видов животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ

1. Сравнительное влияние пренатальных воздействий на структурно-функциональные особенности надпочечников потомства лабораторных мышей / А.Ф. Гафурова, **Р.Т. Сулайманова**, А.Р. Хазиев [и др.] // Морфология. — 2014. — Т. 145, № 3. — С. 53.
2. Особенности пренатального воздействия стероидных половых гормонов на дефинитивную морфологию яичников в эксперименте / Л.Р. Юсупова, **Р.Т. Сулайманова**, Т.Р. Магадеев [и др.] // Морфология. — 2014. — Т. 145, № 3. — С. 231.
3. Проканцерогенные эффекты субтоксических доз синэстрола на яичники потомства у лабораторных мышей / Р.М. Хайруллин, **Р.Т. Сулайманова**, Л.И. Сулайманова [и др.] // Морфология. — 2018. — Т. 153, № 3. — С. 289–290.
4. The experimental evaluation of the transgenerational effect of the synestrol on the morphology of testicles / R.M. Khayrullin, **R.T. Sulaymanova**, A.M. Baybulatova [et al.] // Morphology. — 2018. — Vol. 153, № S3-1. — P. 60.
5. Characteristics of the transgenerational effect of the toxic dose of synestrol on the morphology of ovaries in the experiment / R.M. Khayrullin, **R.T. Sulaymanova**, P.K. Sharma [et al.] // Morphology. — 2018. — Vol. 153, № S3-1. — P. 61.
6. Иммуногистохимический анализ семенников белых лабораторных мышей при пренатальном введении эстрогенов / А.Н. Квочко, **Р.Т. Сулайманова** // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2023. — № 1(22). — С. 97-106. — DOI 10.17238/issn2541-8203.2023.1.97.
7. Морфология гонад потомства мышей при воздействии эстрогена в период пренатального развития органа / **Р. Т. Сулайманова**, А. Н. Квочко, Е. С. Аширкаева // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. — 2023. — № 2. — С. 135-138.

8. Пренатальный эффект эстрогенов на гонады потомства лабораторных мышей / **Р. Т. Сулайманова**, А. Н. Квочко // Вестник АПК Ставрополя. – 2023. – № 1(49). – С. 25-27. – DOI 10.31279/222-9345-2023-12-49-25-27.

9. Экспрессия маркера p53 при пренатальном введении эстрогенов на семенники потомства белых лабораторных мышей / **Р.Т. Сулайманова** // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2023. № 2 (100). С. 227 – 230. DOI: 10.37670/2073-0853-2023-100-2-227-230

10. Исследование пренатального влияния эстрогена на постнатальную морфологию семенников потомства / **Р.Т. Сулайманова** // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2023. №2. С. 74–79. DOI: 10.55170/19973225_2023_8_2_74.

11. Семенники потомства лабораторных мышей при пренатальном введении экспериментальных доз эстрогена / **Р.Т. Сулайманова** // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». 2023. Т. 9. № 1. С. 44–49. DOI: 10.30914/2411-9687-2023-9-1-44-49

12. Молекулярно-биологический маркер BCL-2: анализ семенников при пренатальном введении эстрогенов белым лабораторным мышам / **Р.Т. Сулайманова**, А.Н. Квочко // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2023. Т. 18. № 2. С. 273—281. DOI: 10.22363/2312-797X-2023-18-2-273-281

13. Соматометрические промеры самцов при пренатальном воздействии препарата эстрогенового ряда / **Р. Т. Сулайманова**, А. Н. Квочко // Вестник АПК Ставрополя. – 2023. – № 20(50). – С. 13-16. – DOI: 10.31279/222-9345-2023-13-50-13-16

14. Воздействие препарата эстрогенного ряда на динамику роста потомства лабораторных мышей / А. Н. Квочко, **Р. Т. Сулайманова**, Э. Д. Асхабова, Л. И. Сулайманова // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2023. №3. С. 70–74. DOI: 10.55170/19973225-2023-8-3-70

15. Влияние препарата эстрогенового ряда на соматометрические показатели потомства женского пола / А.Н. Квочко, **Р.Т. Сулайманова** // Вестник КрасГАУ. 2023. № 8 С. 158-163. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-8-158-163.

Патенты

16. Патент (изобретение) № RU2676437 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28 (2006.01). Способ моделирования проканцерогенного действия синэстрола на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей: № 2018100495 : заявл. 09.01.2018: опубл.: 28.12.2018 / **Р.Т. Сулайманова**, Р.М. Хайруллин, А.К. Имаева [и др.]; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). — 16 с.

17. Патент (изобретение) № RU2722988 С1 Российская Федерация, МПК А61М 5/32 (2006.01), А61К 31/565 (2006.01), А61Р 43/00 (2006.01), G09В 23/28

(2006.01). Способ моделирования проканцерогенного действия фулвестранта на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей : № 2019137152 : заявл. 19.11.2019: опубл. : 05.06.2020 / **Р.Т. Сулайманова**, Х.Х. Мурзабаев, И.Р. Рахматуллина [и др.] ; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). — 16 с.

Публикации, индексируемые в Web of Science и Scopus

18. Pro-carcinogenic effects of the antiestrogen fulvestrant on the ovaries of offspring of laboratory mice / **R.T. Sulaymanova**, R.M. Khayrullin, L.I. Sulaymanova // *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. — 2020. — Vol. 230, № S. — P. 74.

19. Dysontogenetic effect of the subtoxic dose of synestrol on the ovaries of the offspring of laboratory mice / **R.T. Sulaymanova**, R.M. Khayrullin, L.M. Gazdalieva, L.I. Sulaymanova // *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. — 2020. — Vol. 230, № S. — P. 73–74.

20. An experimental study of the effects of synestrol during pregnancy on the postnatal morphology of the testicles of the offspring / **R.T. Sulaymanova**, R.M. Khayrullin, A.A. Izmailov [et al.] // *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. — 2020. — Vol. 230, № S. — P. 6–7.

Публикации в материалах конференций в других научно-практических изданиях

21. Изменения эндокринных желез в ответ на удаление левого надпочечника у крыс / **Р. Т. Сулайманова**, Х. Х. Мурзабаев, Н. Н. Заречнова, Х. М. Алиев // *Морфология*. – 2008. – Т. 133, № 2. – С. 131.

22. Сулайманова, Р. Т. Компенсаторно-приспособительные реакции в плаценте / **Р. Т. Сулайманова**, Х. Х. Мурзабаев, Н. Н. Заречнова // *Морфология*. – 2009. – Т. 136, № 4. – С. 134а.

23. Effect of prenatal androgenization at the finger length and 2D:4D digit ratio of laboratory mice / R. M. Khayrullin, A. V. Fomina, **R. T. Sulaymanova**, N. K. Aynullova // *Revista Argentina de Anatomía Clínica*. – 2013. – Vol. 5, No. 2. – P. 124.

24. О факторе риска развития рака молочной железы, связанном с пренатальным обменом эстрогенов / Л.Р. Юсупова, **Р.Т. Сулайманова**, Т.Р. Магадеев [и др.] // *Фундаментальные исследования*. — 2013. — Т. 10, № 1. — С.130–135.

25. Репродуктивные технологии и рак молочной железы / Р.М. Хайруллин, **Р.Т. Сулайманова**, В.В. Кометова, Л.Р. Юсупова // *Ульяновский медико-биологический журнал*. — 2014. — № 4. — С. 47–51.

26. The sinestrol treatments of pregnant mice affect body growth of their offspring in early postnatal development / **R. T. Sulaymanova**, A. R. Khaziev, T. R. Magadeev [et al.] // *The 6th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, Malinska, Rijeka, Croatia, 26–29 июня 2014 года*. – Malinska, Rijeka, Croatia: THE UNIVERSITY OF RIJEKA, 2014. – P. 86.

27. Somatometric and behavioral characteristics of the mice offspring in early postnatal development which was prenatally treatment with fulvestrant / L. R. Yusupova, **R. T. Sulaymanova**, R. M. Khayrullin, L. I. Sulaymanova // The 6th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, Malinska, Rijeka, Croatia, 26–29 июня 2014 года. – Malinska, Rijeka, Croatia: THE UNIVERSITY OF RIJEKA, 2014. – P. 85-86.

28. Growth and behavioral effects of prenatal cortisol injection on early postnatal development of offspring of laboratory mice / A. F. Gafurova, L. R. Yusupova, R. I. Zaripova, **R. T. Sulaymanova** [et al.] // The 6th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy, Malinska, Rijeka, Croatia, 26–29 июня 2014 года. – Malinska, Rijeka, Croatia: THE UNIVERSITY OF RIJEKA, 2014. – P. 77.

29. Дизрапторы как экологический фактор риска опухолей репродуктивной системы / Р.М. Хайруллин, **Р.Т. Сулайманова**, Л.И. Сулайманова, Р.И. Бахтияров // Медико-физиологические проблемы экологии человека: сборник научных трудов V Всероссийской конференции с международным участием. — Ульяновск : УлГУ, 2014. — С. 193–195.

30. Влияние введения гидрокортизона ацетата беременным самкам мышей на уровень тревожности их потомства / Р. Бахтияров, **Р. Т. Сулайманова**, Р. И. Зарипова [и др.] // Новое слово в науке и практике: гипотезы и апробация результатов исследований. – 2015. – № 19. – С. 7-10.

31. Comparative prenatal effects of sex steroids on anogenital distance of the offspring of laboratory mice / R.M. Khayrullin, **R.T. Sulaymanova**, R.I. Bakhtiyarov [et al.] // The 7th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy: Book of abstracts ISCAA. — Bratislava : Comenius University in Bratislava, 2015. — 140 p.

32. Введение гидрокортизона ацетата беременным самкам мышей и уровень тревожности их потомства / **Р. Т. Сулайманова**, Л. Р. Юсупова, Р. И. Бахтияров, А. Х. Нугуманова // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям : материалы XII международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, 22–23 марта 2016 года. – Новосибирск: Филиал "Гео" Издательства СО РАН, Издательский дом "Манускрипт", 2016. – С. 239-240.

33. Khayrullin, R.M. Effect of prenatal exposure of various doses of synestrol on ovarian morphology in adult life of offspring / R.M. Khayrullin, **R.T. Sulaymanova**, L.R. Yusupova // 112th Annual Meeting Deutsche Anatomische Gesellschaft, September 20–22, 2017. — Würzburg, Germany : Würzburg, 2017. — P. 34.

34. Сулайманова, Р.Т. Использование аногенитального расстояния в оценке пренатальных феминизирующих эффектов эстрогенов на потомство мужского пола в эксперименте / **Р.Т. Сулайманова**, Р.М. Хайруллин // Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека: сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием. — Оренбург : Оренбургский государственный медицинский университет, 2017. — С. 196–198.

35. Изменения морфологии яичников лабораторных мышей при пренатальном воздействии эстрогенов / **Р.Т. Сулайманова**, Н.Д. Ахметова, Д.О. Исламгареева // *Anatomicum Latinicumque* : сборник статей ; под ред. проф. Р.М. Хайруллина. — Ульяновск : УЛГУ, 2017. — С. 186–188.

36. Toxic doses of estrogen during pregnancy lead to irreversible changes in the ovaries of the offspring / R.M. Khayrullin, **R.T. Sulaymanova** // XXVI International Symposium on Morphological Sciences. Book of Abstracts. — Prague : AMCA, 2018. — P. 35.

37. Гистологическая структура яичников потомства лабораторных мышей при токсическом действии синестрола в критический период развития / Р. М. Хайруллин, **Р. Т. Сулайманова**, Л. И. Сулайманова [и др.] // *Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал)*. – 2019. – Т. 3, № 2-2. – С. 99-100. – DOI 10.17116/operhirurg20193022003.

38. Морфометрические показатели семенников потомства при воздействии синестрола в пренатальный период / **Р. Т. Сулайманова** // *Морфология*. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 273-274.

39. Экспериментальные модели трансгенерационных эффектов влияния эстрогенов на морфологию репродуктивных органов потомства в постнатальном онтогенезе / **Р.Т. Сулайманова** // *Морфологические ведомости*. — 2019. — Т. 27, № 1. — С. 36–44.

40. Морфология яичников потомства лабораторных мышей при пренатальном действии субтоксической дозы синестрола / **Р. Т. Сулайманова**, Р. М. Хайруллин, С. Ю. Злобина [и др.] // *Детская медицина Северо-Запада*. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 326-327.

41. Пренатальный эффект синестрола на морфологию яичников потомства лабораторных мышей / **Р. Т. Сулайманова**, Р. М. Хайруллин, С. Ю. Злобина [и др.] // *Детская медицина Северо-Запада*. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 325.

42. Трансгенерационный эффект влияния токсической дозы синестрола на морфофункциональную характеристику яичников потомства лабораторных мышей / **Р. Т. Сулайманова**, Р. М. Хайруллин, А. С. Выродов [и др.] // *Детская медицина Северо-Запада*. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 323-324.

43. Трансгенерационный эффект пренатального действия синестрола на морфофункциональную характеристику яичников потомства лабораторных мышей / **Р. Т. Сулайманова**, Р. М. Хайруллин, С. Ю. Злобина [и др.] // *Forcipe*. – 2020. – Т. 3, № 4. – С. 5-11.

44. Эффекты пренатального воздействия субтоксической дозы синэстрола на яичники потомства лабораторных мышей / **Р.Т. Сулайманова** // *Морфологические ведомости*. — 2020. — Т. 28, № 1. — С. 37–42.

45. Морфология яичников потомства мышей в постнатальном онтогенезе при воздействии эстрогенов на материнский организм / **Р. Т. Сулайманова** // *Современные проблемы морфологии : Материалы научной конференции, посвященной памяти академика РАН, профессора Льва Львовича Колесникова*, Москва, 10 декабря 2020 года. – Москва: Издательско-полиграфический центр "Научная книга", 2020. – С. 221-223.

46. Изучение половых различий аногенитального расстояния у потомства лабораторных мышей / З. И. Идрисова, Э. Р. Акрамова, А. С. Выродов, **Р. Т. Сулайманова** [и др.] // Forcipe. – 2021. – Т. 4, № 2. – С. 16-20.

47. Морфологические особенности яичников потомства лабораторных мышей, которым вводили эстрогены во время беременности / **Р. Т. Сулайманова**, Р. М. Хайруллин, А. И. Лебедева [и др.] // Педиатр. – 2021. – Т. 12, № 6. – С. 55-62. – DOI 10.17816/PED12655-62.

48. Аногенитальное расстояние как биомаркер пренатального действия эстрогенов и риска развития репродуктивных нарушений потомства / **Р. Т. Сулайманова** // Журнал анатомии и гистопатологии. — 2021. — Т. 10, № 2. — С. 38–42.

49. Effect of the prenatal action of fulvestrant on the ovaries of the offspring of laboratory mice / **R. T. Sulaymanova** // RUDN Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 25, No. 3. – P. 256-262. – DOI 10.22363/2313-0245-2021-25-3-256-262.

50. Соматометрические показатели потомства лабораторных мышей при пренатальном воздействии синэстрола / **Р. Т. Сулайманова** // Морфологические ведомости. – 2022. – Т. 30, № 2. – С. 61-63.

51. Экспрессия маркера Ki-67 при пренатальном введении эстрогенов на яичники потомства / **Р. Т. Сулайманова** // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2022. – Т. 16, № 3. – С. 73-77.

52. Изменение соматометрических показателей потомства лабораторных мышей при пренатальном воздействии фулвестранта / Д. Д. Литвинова, **Р. Т. Сулайманова**, Э. Д. Асхабова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2022. – Т. 16, № 3. – С. 78-82.

53. Пренатальное влияние синэстрола на динамику роста потомства / **Р. Т. Сулайманова**, А. С. Выродов, Д. Д. Литвинова [и др.] // Forcipe. – 2022. – Т. 5, № S2. – С. 466-467.

Монографии

54. Морфология плаценты как индикатор экоинтоксикации сурьмой / Кенешбаев Б.К., Тулекеев Т.М., **Сулайманова Р.Т.**, Хайруллин Р.М.; под ред. Проф. Р.М. Хайруллина. - СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2023. – 138с.

Научно-методические рекомендации

55. Морфологическая и иммуногистохимическая оценка яичников при введении эстрогенов в пренатальном периоде / **Р.Т. Сулайманова**, В.С. Скрипкин, А.Н. Квочко, Р.М. Хайруллин // Ставрополь: АГРУС Ставропольского гос. Аграрного ун-та, 2023. – 52 с. ISBN 978-5-9596-1923-7

56. Морфология и иммуногистохимия семенников животных при введении эстрогенов в пренатальном периоде / В.С. Скрипкин, **Р.Т. Сулайманова**, А.Н. Квочко, Р.М. Хайруллин // Ставрополь: АГРУС Ставропольского гос. аграрного ун-та, 2023. – 40 с. ISBN 978-5-9596-1922-0

Подписано в печать 17.11.2023 г.
Формат 60X84/16. Усл. печ. л. 2,0.
Тираж 100 экз. Заказ № 107.

Цех оперативной полиграфии ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»,
г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15