

Морфофункциональные изменения яичек плода человека при внутриутробной гипоксии

Т.В. Палатова¹, А.Б. Бучарская², Е.С. Воронина¹, А.В. Медведева¹, С.С. Пахомий¹, О.С. Годяге¹, Г.Н. Маслякова¹

¹ ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия

² НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия

Резюме. Введение. Внутриутробная гипоксия занимает важное место среди факторов риска нарушений развития плода и является одним из самых частых осложнений при беременности. Формирование гипоксии в антенатальном периоде нарушает развитие половой системы плода, что в дальнейшем приводит к негативным последствиям. Цель исследования – изучить влияние хронической внутриутробной гипоксии на морфофункциональные особенности развития семенников плодов в разные периоды гестации. **Материалы и методы.** Ткани яичек 78 плодов (аутопсийный материал), умерших на сроке гестации от 19-й до 40-й недели, были исследованы гистологическими и иммуногистохимическими методами (с использованием антител к Ki-67, Vcl 2, AR, ER, FGF).

Результаты. При морфометрическом исследовании обнаружено уменьшение количества канальцев, количества клеток в канальцах, площади канальцев с нарастанием площади стромы. При иммуногистохимическом исследовании отмечались слабая экспрессия маркера пролиферации и апоптоза, выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора и преимущественно слабая андрогенового рецептора. Экспрессия фактора роста фибробластов нарастала до 29-й недели, затем резко снижалась. **Заключение.** В результате проведенных исследований было показано, что хроническая гипоксия приводит к повреждению половых клеток и атрофии желез в яичках плодов, а также развитию компенсаторных механизмов, проявляющихся в экспрессии ингибитора апоптоза. Слабая экспрессия андрогенового рецептора и выраженная экспрессия эстрогенового рецептора на протяжении всех периодов гестации свидетельствуют о нарушении процессов пролиферации и снижении функциональной активности интерстициальных эндокриноцитов на фоне гипоксии. Данные структурные изменения в морфогенезе яичек могут приводить к нарушениям фертильности.

Ключевые слова: гипоксия, яичко, иммуногистохимия, нарушение фертильности, антенатальный период

Для корреспонденции: Татьяна Васильевна Палатова. E-mail: iamnot88@bk.ru

Для цитирования: Палатова Т.В., Бучарская А.Б., Воронина Е.С., Медведева А.В., Пахомий С.С., Годяге О.С., Маслякова Г.Н. Морфофункциональные изменения яичек плода человека при внутриутробной гипоксии. Клини. эксп. морфология. 2022;11(2):43–53. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.43-53.

Финансирование. Исследование было частично поддержано в рамках выполнения НИР Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского (№ АААА-А18-118032190090-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 14.10.2021. Получена после рецензирования 17.01.2022. Принята в печать 28.02.2022.

Morphological and functional features in human fetal testicles during prenatal hypoxia

T.V. Palatova¹, A.B. Bucharskaya², E.S. Voronina¹, A.V. Medvedeva¹, S.S. Pahomy¹, O.S. Godage¹, G.N. Maslyakova¹

¹ V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia

² Research Institute of Fundamental and Clinic Uronephrology, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia

Abstract. Introduction. Intrauterine hypoxia is one of the most frequent complications in pregnancy. It is one of the risk factors of fetal development disorders. In the antenatal period, the effects of hypoxia on reproductive system can impair fetus development and lead to negative consequences. The aim was to study

pathological and functional features of testes development in different periods of gestation with chronic intrauterine hypoxia.

Materials and methods. We examined autopsies of testicular tissues of 78 fetuses deceased at gestation weeks 19–40. Histological and immunohistochemical methods (using antibodies to Ki-67, Bcl 2, AR, ER, and FGF) were employed.

Results. Morphometric examination showed a decrease in the number of tubules, cells in the tubules, and the area of the tubules with a significant increase in the stromal area. Immunohistochemistry revealed a weak expression of proliferation and apoptosis marker, a pronounced diffuse expression of estrogen receptor, and a weak expression of androgen receptor. Fibroblast growth factor expression was increasing up to week 29 and then sharply decreased.

Conclusion. Chronic hypoxia leads to damage of germ cells and gland atrophy in the testicles of fetuses. Prolonged oxygen deprivation in the testicular tissue triggers compensatory mechanisms, which manifest in the apoptosis inhibitor expression. Hypoxia disrupts proliferation processes and reduces the functional activity of interstitial endocrinocytes, which is confirmed by the weak AR expression and pronounced ER expression during all gestation periods. These structural changes in testicular morphogenesis may lead to impaired fertility.

Keywords: hypoxia, testicle, immunohistochemistry, fertility disorders, antenatal period

Corresponding author: Tatyana V. Palatova. E-mail: iamnot88@bk.ru

For citation: Palatova T.V., Bucharskaya A.B., Voronina E.S., Medvedeva A.V., Pahomy S.S., Godage O.S., Maslyakova G.N. Morphological and functional changes features in human fetal testicles during prenatal hypoxia. Clin. exp. morphology. 2022;11(2):43–53 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.43-53.

Funding. The study was partially supported as part of the research project V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University (No. AAAA-A18-118032190090-2).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.10.2021. **Received in revised form** 17.01.2022. **Accepted** 28.02.2022.

Введение

Репродуктивная система плода начинает формироваться внутриутробно с 8–9-й недели гестации. Развитие мужской половой системы требует активной деятельности генетических и гормональных факторов, к которым относятся продукты Y-хромосомы и продукты секреции тестикулов самого эмбриона [1–3].

Одним из наиболее значимых факторов паракриной регуляции в яичке является влияние тестостерона, вырабатываемого локально интерстициальными эндокриноцитами [3]. Исследования показали [4], что у животных с выключенными рецепторами андрогенов в перитубулярных миоидных клетках определяются нарушение функции sustentоцитов, азооспермия и бесплодие.

Сустентоциты вырабатывают различные факторы роста, включая фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), который действует в качестве паракриного регулятора и способствует обновлению и развитию зародышевых клеток, интерстициальных эндокриноцитов и перитубулярных миоидных клеток [5–7].

Среди факторов риска нарушений развития плода важное место занимает гипоксия, которая является одним из самых частых осложнений при беременности. Воздействие гипоксии на развивающуюся половую систему плода может нарушить дальнейшее ее развитие и привести к негативным последствиям [2, 8, 9].

Цель исследования – изучить влияние хронической внутриутробной гипоксии на морфофункциональные

особенности развития семенников плодов в разные периоды гестации.

Материалы и методы

Проведена морфологическая оценка яичек 78 плодов (аутопсийный материал), умерших на сроке гестации от 19-й до 40-й недели. Весь аутопсийный материал был разделен на две группы. Первую группу (основную) составили 47 плодов, умерших в результате множественных пороков развития, асфиксии на фоне тяжелого течения гестоза, инфекционных заболеваний матери с последующим инфицированием последа. Основным критерием включения в основную группу являлось наличие хронической внутриутробной гипоксии плода, выявляемое при аутопсии (признаки задержки внутриутробного развития) и исследовании последа. У всех плодов данной группы на основании морфологического исследования последа отмечены признаки хронической плацентарной недостаточности в виде ишемических и геморрагических инфарктов, отложения фибриноида на поверхности ворсин, склероза ворсин, выраженности синцитиальных почек, инфицирования последа.

Вторую группу (сравнения) составили плоды (31 случай), умершие интра- или антенатально в результате ante- и интранатальной асфиксии, обусловленной острым нарушением маточно-плацентарного кровообращения вследствие, как правило, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты.

Таблица 1 | Table 1

Масса и длина тела плодов при острой и хронической гипоксии |
Weight and body length of the fetuses in acute and chronic hypoxia

Параметр Parameter	Острая гипоксия Acute hypoxia Me [25; 75]				Хроническая гипоксия Chronic hypoxia Me [25; 75]			
	19–22	23–25	26–29	30–40	19–22	23–25	26–29	30–40
Срок гестации, недели Gestation period, weeks								
Число случаев, n Number of patients, n	10	8	7	6	15	14	9	9
Масса плода, г Weight of the fetus, g	479 [455; 487]	640 [554; 850]	1035 [980; 1090]	3260 [2517; 3362]	477,5 [456; 490]	600 [480; 613]	930 [670; 1080]	1550 [1190; 1810]
Длина тела плода, см Body length of the fetus, cm	24 [22; 25]	31 [27; 34]	36 [32; 40]	49 [45; 51]	23 [21; 24]	29 [25; 31]	35 [28; 38]	43 [33; 44]

Характеристика плодов, вошедших в исследование, представлена в таблице 1.

Изъятые на секции яички плодов после фиксации в 10% растворе нейтрального формалина и проводки по спиртам возрастающей концентрации заливали в парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 4–5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозинном. Морфометрический анализ гистологических препаратов и фотографирование проводили с помощью микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-101 («ЛЮМО», Россия).

В каждом случае при $\times 246,4$ и $\times 774$ проводили подсчет следующих показателей: количество канальцев, количество клеток в канальцах, количество сосудов в строме, количество интерстициальных эндокриноцитов, диаметр канальцев, площадь паренхимы и стромы.

После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ исследование согласно стандартному протоколу ИГХ окрашивания. В качестве системы визуализации использовали REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, США). Панель антител приведена в таблице 2.

При проведении реакции с иммуногистохимическими маркерами использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводили для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий

окрашивания и повышения объективности полученных результатов. Оценку ИГХ реакции проводили в 30 полях зрения при $\times 774$ путем подсчета процента клеток, дающих положительную экспрессию, и оценивали их в процентах от поля зрения на этом увеличении. Степень выраженности экспрессии оценивали количественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

При статистическом анализе полученных результатов использовали пакеты компьютерных программ IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM, США), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США).

Процедуры статистического анализа выполняли с помощью программы IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). При проверке выборочных совокупностей исследуемых величин на нормальность распределения по методу Колмогорова–Смирнова выявлено, что распределение исследуемых параметров отличается от нормального, поэтому для анализа количественных признаков использовали методы непараметрической статистики с расчетом медианы и межквартильного размаха (25 и 75 перцентили) – Me [25; 75]. Морфометрические показатели попарно сравнивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Сравнение показателей иммуногистохимической реакции проводили с помощью критерия Фишера. Различия были достоверны при $\phi_{эмп} \geq 2,31$.

Таблица 2 | Table 2

Характеристика антител для ИГХ исследования |
Characteristics of the antibodies used in the study

Антитело Antibody	Клон Clone	Разведение Dilution	Фирма, страна производитель Manufacturer
Ki67	clone SP6, ab16667	1:100	Abcam, Великобритания Abcam, Great Britain
Bcl 2	clone 124	1:100	Dako, Великобритания Dako, Great Britain
FGFR1	PAb, ab63601	1:50	Abcam, Великобритания Abcam, Great Britain
Androgen receptor	clone AR441, M3562	1:50	Dako, Великобритания Dako, Great Britain
Estrogen receptor β 1	clone PPG5/10, M7292	1:20	Dako, Великобритания Dako, Great Britain

Результаты

Морфофункциональные особенности яичек плодов в 19–22 недели гестации

В основной группе исследования (плоды с хронической внутриутробной гипоксией) при микроскопии яичек плодов 19–22 недель гестации под плотной соединительнотканной оболочкой определялись округлые и вытянутые семенные канальцы, количество которых колебалось от 13 до 18 в поле зрения при $\times 246,4$ ($Me=15$) (табл. 3). Базальная мембрана отдельных канальцев была нечеткая, фрагментированная. Медиана диаметра канальцев была равна 0,048 мкм, в то время как при острой гипоксии – 0,052 мкм. Просвета в канальцах не наблюдалось. В канальцах преобладали мелкие клетки, которые располагались хаотично, некоторые из них были дистрофически изменены (рис. 1 А). В одном канальце насчитывали от 33 до 40 клеток при $\times 774$ ($Me=37$) (табл. 3). По данным литературы [2], крупные и средних размеров половые клетки с центрально расположенным ядром являются сперматогониями типа А. Эти клетки обнаруживались в небольшом количестве, преобладали первичные го-

ноциты и незрелые суспендоциты. Медиана площади паренхимы составила 0,009 мкм². Межканальцевая ткань была образована рыхлой соединительной тканью, в некоторых случаях с признаками отека. Разделения на дольки не наблюдалось. В строме в виде групп и изолированно располагались полигональные клетки с вытянутыми ядрами и крупные эозинофильные округлые клетки с большим ядром – интерстициальные эндокриноциты, медиана составляет 9 клеток в поле зрения. Медиана площади интерстиция составила 0,012 мкм².

В группе сравнения (плоды с острой гипоксией) достоверные отличия наблюдались по следующим показателям: количество, диаметр канальцев, площадь паренхимы и стромы.

В группе хронической гипоксии пролиферативная активность эпителия канальцев была слабой (+), в некоторых полях зрения экспрессия маркера Ki 67 отсутствовала (рис. 1 В). Экспрессия маркера апоптоза была слабой (+) и умеренно выраженной (++) в интерстициальных эндокриноцитах, в гоноцитах – слабая (+) или отсутствовала (рис. 1 С). Экспрессия эстрогенового рецептора была выраженной, диффузной (рис. 1 D). Андрогеновый рецептор экспрессировался

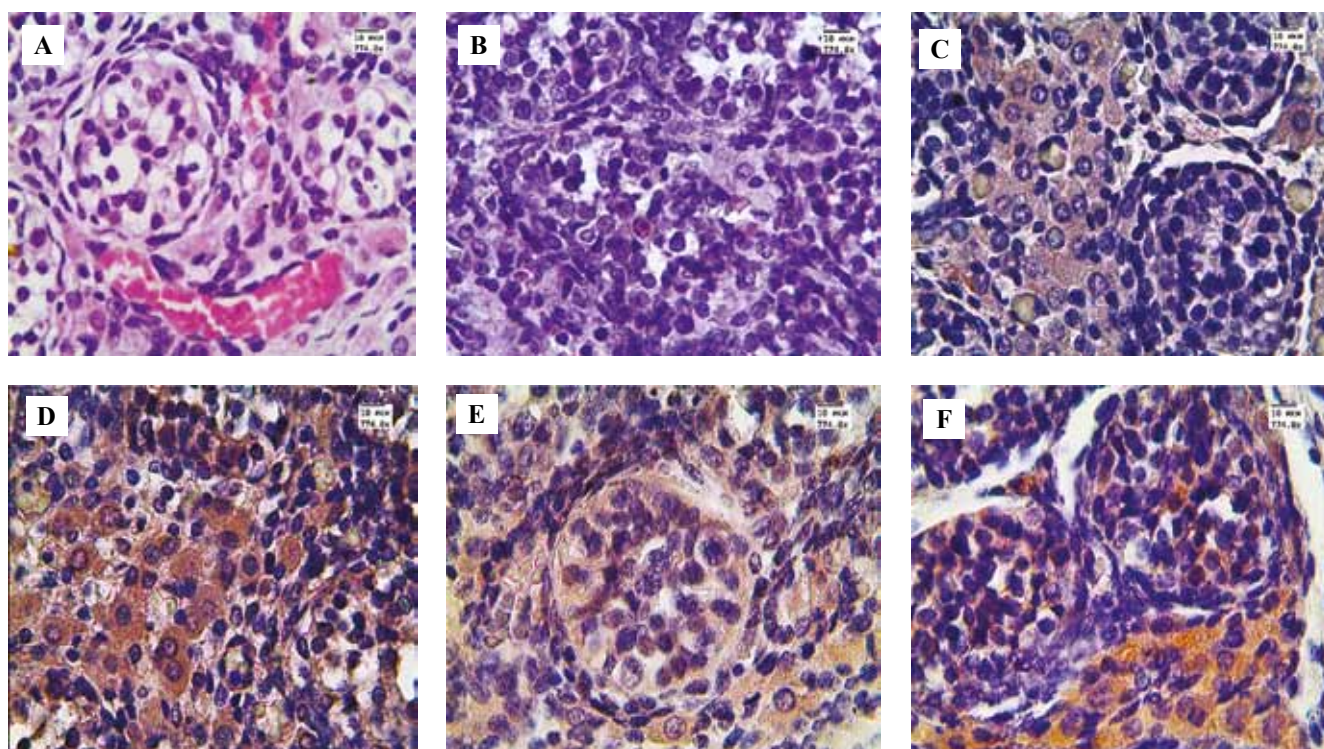


Рис. 1. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 19–22 недели гестации.

А – дистрофия сперматогенного эпителия. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 774$. В – единичная клетка с экспрессией маркера пролиферации Ki 67. С – умеренная цитоплазматическая реакция интерстиция с маркером апоптоза Bcl 2. D – выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – слабая диффузная экспрессия андрогенового рецептора AR. F – умеренная экспрессия FGF в интерстиции. B–F – ИГХ окрашивание, $\times 774$

Fig. 1. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 19–22.

A – dystrophy of the spermatogenic epithelium. H&E stain, $\times 774$. B – single cell with expression of the proliferation marker Ki-67. C – moderate cytoplasmic reaction of the apoptosis marker Bcl 2 in the interstitium. D – low diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – weak diffuse expression of the androgen receptor AR. F – moderate expression of FGF in the interstitium. B–F – IHC assay, $\times 774$

Таблица 3 | Table 3

**Морфометрические показатели структурных компонентов яичек плодов при гипоксии |
Morphometric parameters of the structural components in the fetal testicular tissue in hypoxia**

Наименование показателя Parameter name	Значение показателя, Ме [25; 75] Parameter value, Me [25; 75]								Уровень р p-value
	19–22		23–25		26–29		30–40		
Срок гестации, недели Gestation period, weeks									
Гипоксия Hypoxia	острая acute n=161	хроническая chronic n=193	острая acute n=103	хроническая chronic n=179	острая acute n=219	хроническая chronic n=160	острая acute n=112	хроническая chronic n=100	
Количество канальцев в поле зрения, ×246,4 Number of tubules, ×246.4	18 [14; 19]	15 [13; 18]	16 [13; 21]	16 [13; 18]	18 [16; 19]	17 [15; 20]	19 [17; 22]	15 [13; 16]	P ¹ =0,0001 P ² =0,017 P ³ =0,001 P ⁴ =0,0001
Количество клеток в канальцах, ×774 Number of cells in the tubules, ×774	37 [33; 44]	37 [33; 40]	34 [26; 46]	37 [29; 47]	38 [34; 46]	26 [23; 33]	46 [45; 47]	33 [31; 37]	P ¹ =0,057 P ² =0,824 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,0001
Количество сосудов, ×774 Number of vessels, ×774	5 [3; 8]	6 [3; 8]	7 [3; 14]	11 [7; 22]	7 [3; 11]	11 [7; 14]	10 [9; 11]	22 [15; 27]	P ¹ =0,634 P ² =0,0001 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,0001
Количество интерстициальных эндокриноцитов, ×774 Number of interstitial endocrinocytes, ×774	7 [5; 11]	9 [5; 10]	6 [5; 8]	11 [9; 14]	5 [5; 7]	12 [10; 13]	4 [4; 5]	4 [2; 7]	P ¹ =0,115 P ² =0,0001 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,109
Диаметр канальцев, мкм ×246,4 Tubule diameter, μm ×246.4	0,052 [0,050; 0,058]	0,048 [0,04; 0,052]	0,057 [0,050; 0,061]	0,053 [0,048; 0,063]	0,062 [0,055; 0,068]	0,055 [0,05; 0,06]	0,068 [0,067; 0,070]	0,064 [0,055; 0,068]	P ¹ =0,0001 P ² =0,007 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,0001
Диаметр клеток в канальцах, мкм ×774 Tubular cell diameter, μm ×774	0,008 [0,007; 0,009]	0,007 [0,0065; 0,008]	0,008 [0,007; 0,009]	0,007 [0,006; 0,007]	0,007 [0,006; 0,008]	0,008 [0,007; 0,008]	0,008 [0,008; 0,008]	0,007 [0,007; 0,008]	P ¹ =0,013 P ² =0,001 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,0001
Площадь канальцев мкм ² , ×774 Tubular area, μm ² , ×774	0,0110 [0,008; 0,0123]	0,009 [0,007; 0,0101]	0,0119 [0,009; 0,0124]	0,009 [0,006; 0,0105]	0,0127 [0,010; 0,0130]	0,0073 [0,005; 0,0085]	0,0137 [0,0135; 0,0138]	0,0092 [0,0083; 0,011]	P ¹ =0,0001 P ² =0,0001 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,001
Площадь стромы мкм ² , ×774 Stromal area, μm ² , ×774	0,0100 [0,008; 0,0130]	0,012 [0,011; 0,0137]	0,0091 [0,008; 0,0112]	0,012 [0,010; 0,0141]	0,0083 [0,008; 0,0104]	0,0137 [0,012; 0,0152]	0,0076 [0,007; 0,0077]	0,0118 [0,01; 0,0126]	P ¹ =0,0001 P ² =0,0001 P ³ =0,0001 P ⁴ =0,0001

n – число полей зрения

P¹ – при сравнении показателей на 19–22-й неделе гестации

P² – при сравнении показателей на 23–25-й неделе гестации

P³ – при сравнении показателей на 26–29-й неделе гестации

P⁴ – при сравнении показателей на 30–40-й неделе гестации

n – number of fields of view

P¹ – at comparing parameters at gestation weeks 19–22

P² – at comparing parameters at gestation weeks 23–25

P³ – at comparing parameters at gestation weeks 26–29

P⁴ – at comparing parameters at gestation weeks 30–40

слабо (+) в цитоплазме клеток стромы и гоноцитах (рис. 1 E). FGF определялся слабо (+) и умеренно (++) в цитоплазме в основном в интерстициальных эндокриноцитах, в канальцах он был выражен в отдельных клетках (рис. 1 F). Данные по количеству (%) окрашенных клеток с расчетом медианы и межквартильного размаха (25 и 75 перцентили) – Me [25; 75] представлены в таблице 4.

Гистологические особенности яичек плодов 23–25 недель гестации

В группе плодов с хронической гипоксией при микроскопии яичек в 23–25 недель гестации нара-

тали дистрофические изменения эпителио-сперматогенного слоя, преобладающими клетками оставались клетки мелких размеров. В части канальцев отмечали деструкцию базальной мембраны. Диаметр и площадь канальцев были достоверно ниже, чем в группе плодов с острой гипоксией (табл. 3). В строме определялись крупные интерстициальные эндокриноциты, располагавшиеся полями (Me равна 11 клеткам в поле зрения) (рис. 2 A). В части случаев отмечали признаки нарушения кровообращения в виде отека, полнокровия сосудов. Медиана площади стромы была равна 0,012 мкм² (в группе сравнения – 0,009 мкм²). При ИГХ исследовании клетки имели слабую пролиферативную активность,

Таблица 4 | Table 4

Экспрессия иммуногистохимических маркеров в яичках плода при различных сроках гестации | Immunohistochemical marker expression in the testicles of the fetus at various gestation weeks

Показатель Parameter	Значение показателя, Me [25; 75] Parameter value, Me [25; 75]								Уровень p p-value
	19–22		23–25		26–29		30–40		
Срок гестации, недели Gestation period, weeks									
Гипоксия Нуроксия	острая acute	хроническая chronic	острая acute	хроническая chronic	острая acute	хроническая chronic	острая acute	хроническая chronic	
Ki-67	12 [10; 19]	1 [0; 2]	12 [9; 13]	2 [1; 3]	32 [29; 40]	27 [19; 35]	30 [27; 34]	11 [2; 17]	$\phi^1=3,585^*$ $\phi^2=2,991^*$ $\phi^3=1,64$ $\phi^4=3,41^*$
Bcl 2	11 [9; 12]	21 [17; 32]	22 [19; 24]	15 [12; 18]	11 [9; 15]	12 [9; 13]	7 [5; 10]	11 [8; 13]	$\phi^1=1,952$ $\phi^2=1,28$ $\phi^3=0,22$ $\phi^4=0,99$
ER	16 [11; 25]	95 [87; 99]	15 [14; 22]	80 [80; 90]	1 [0; 2]	94 [91; 96]	4 [1; 6]	98 [95; 100]	$\phi^1=13,21^*$ $\phi^2=10,03^*$ $\phi^3=17,30^*$ $\phi^4=15,22^*$
AR	90 [85; 95]	70 [50; 70]	85 [80; 92]	60 [50; 71]	50 [45; 60]	40 [35; 42]	43 [40; 48]	65 [55; 72]	$\phi^1=3,65^*$ $\phi^2=4,06^*$ $\phi^3=1,43$ $\phi^4=3,15^*$
FGFR	36 [25; 50]	45 [35; 50]	60 [47; 67]	50 [38; 61]	65 [60; 70]	75 [70; 80]	11 [9; 15]	7 [5; 9]	$\phi^1=1,30$ $\phi^2=1,42$ $\phi^3=1,55$ $\phi^4=0,99$

ϕ^1 – при сравнении показателей на 19–22-й неделе гестации

ϕ^2 – при сравнении показателей на 23–25-й неделе гестации

ϕ^3 – при сравнении показателей на 26–29-й неделе гестации

ϕ^4 – при сравнении показателей на 30–40-й неделе гестации

* – различия достоверны

ϕ^1 – at comparing parameters at gestation weeks 19–22

ϕ^2 – at comparing parameters at gestation weeks 23–25

ϕ^3 – at comparing parameters at gestation weeks 26–29

ϕ^4 – at comparing parameters at gestation weeks 30–40

* – differences are reliable

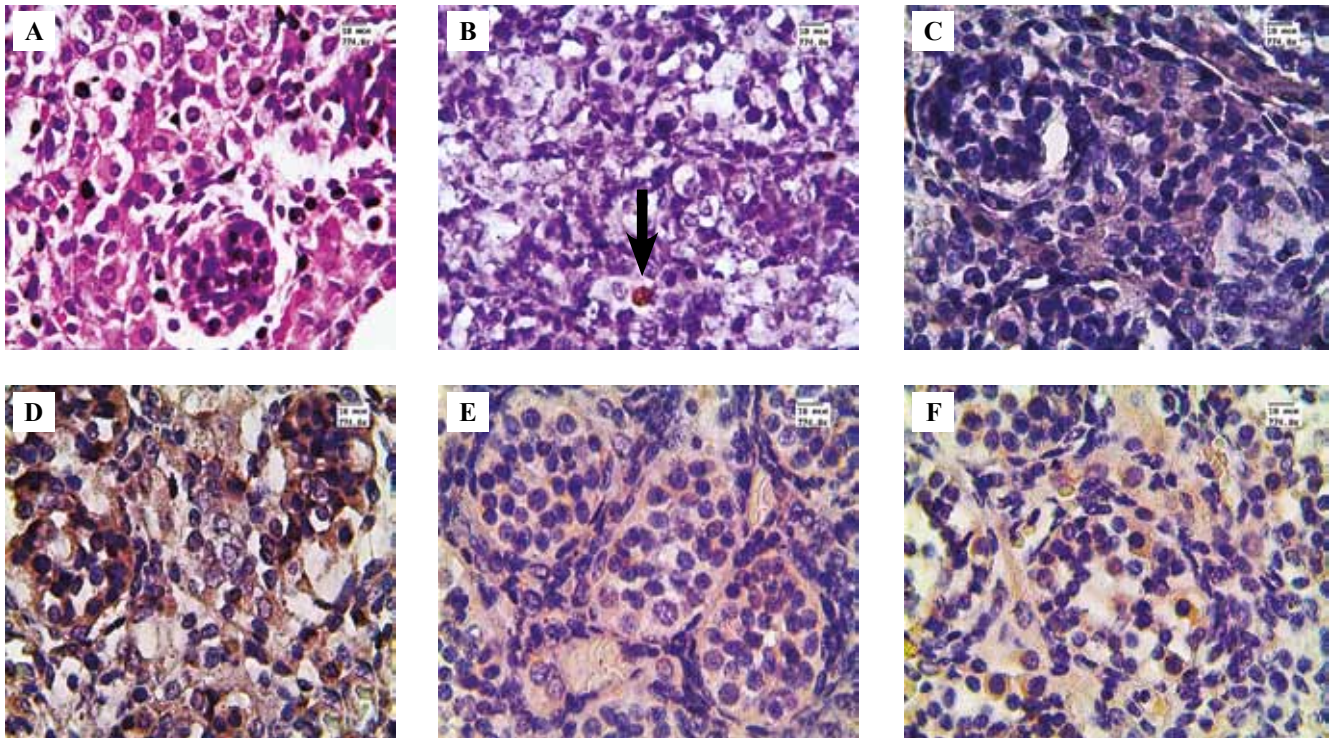


Рис. 2. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 23–25 недель гестации. А – отсутствие просвета в канальце, большое количество клеток Лейдига. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 774$. В – единичная клетка с экспрессией маркера пролиферации Ki 67 (стрелка). С – слабая цитоплазматическая реакция интерстиция с маркером апоптоза Bcl 2. D – умеренная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – слабая экспрессия андрогенового рецептора AR. F – слабая экспрессия FGF в интерстиции и эпителии канальцев. В–F – ИГХ окрашивание, $\times 774$

Fig. 2. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 23–25.

A – the absence of a lumen in the tubule, a large number of Leydig cells. H&E stain, $\times 774$. B – single cell with expression of the proliferation marker Ki 67 (arrow). C – low cytoplasmic reaction with apoptosis marker Bcl 2 in the interstitium. D – moderate diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – low expression of the androgen receptor AR. F – low expression of FGF in the interstitium and epithelium of the tubules. B–F – IHC assay, $\times 774$

экспрессия маркера апоптоза была умеренно и слабо выраженной в интерстициальных эндокриноцитах и гоноцитах (рис. 2 В, С). Экспрессия маркера эстрогенового рецептора оставалась сильно выраженной (+++) в канальцах и умеренно выраженной (++) в интерстиции (рис. 2 D). Андрогеновый рецептор определялся в цитоплазме в гоноцитах и клетках интерстиция (рис. 2 E). FGF так же, как и в более ранний период, слабо (+) экспрессировался в интерстициальных эндокриноцитах и клетках эпителио-сперматогенного слоя (рис. 2 F, табл. 2).

В группе сравнения (плоды с острой гипоксией) отмечалось преобладание канальцевой ткани. Клетки сперматогенного эпителия находились ближе к базальной мембране, формируя просвет в извитых семенных канальцах. Морфометрические параметры приведены в таблице 3.

Гистологические особенности яичек плодов 26–29 недель гестации

В 26–29 недель гестации в яичках плодов основной группы базальная мембрана части канальцев была

разрушена, эпителиоциты дистрофически изменены, располагались хаотично (рис. 3 А). В 50% случаев наблюдали отслойку эпителио-сперматогенного слоя от базальной мембраны. Медиана числа клеток в канальце в этот период достоверно уменьшалась по сравнению с группой острой гипоксии: с 38 клеток в основной группе до 26 в группе сравнения. Стромальный компонент доминировал над паренхиматозным, и медиана площади стромы была равна $0,0137 \text{ мкм}^2$, что оказалось выше в сравнении с группой плодов, умерших от острой гипоксии ($0,0083 \text{ мкм}^2$). При ИГХ исследовании в этот период было установлено усиление пролиферативной активности в эпителии канальцев. Экспрессия маркера апоптоза была выраженной (+++) в интерстициальных эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках, в канальцах отмечалась слабая (+) экспрессия в единичных клетках (рис. 3 В, С). Экспрессия маркера эстрогенового рецептора в канальцах была ярко выраженной (+++), в интерстиции – умеренно (++) (рис. 3 D). По сравнению с группой острой гипоксии количество экспрессирующих эстрогеновый рецептор клеток в группе

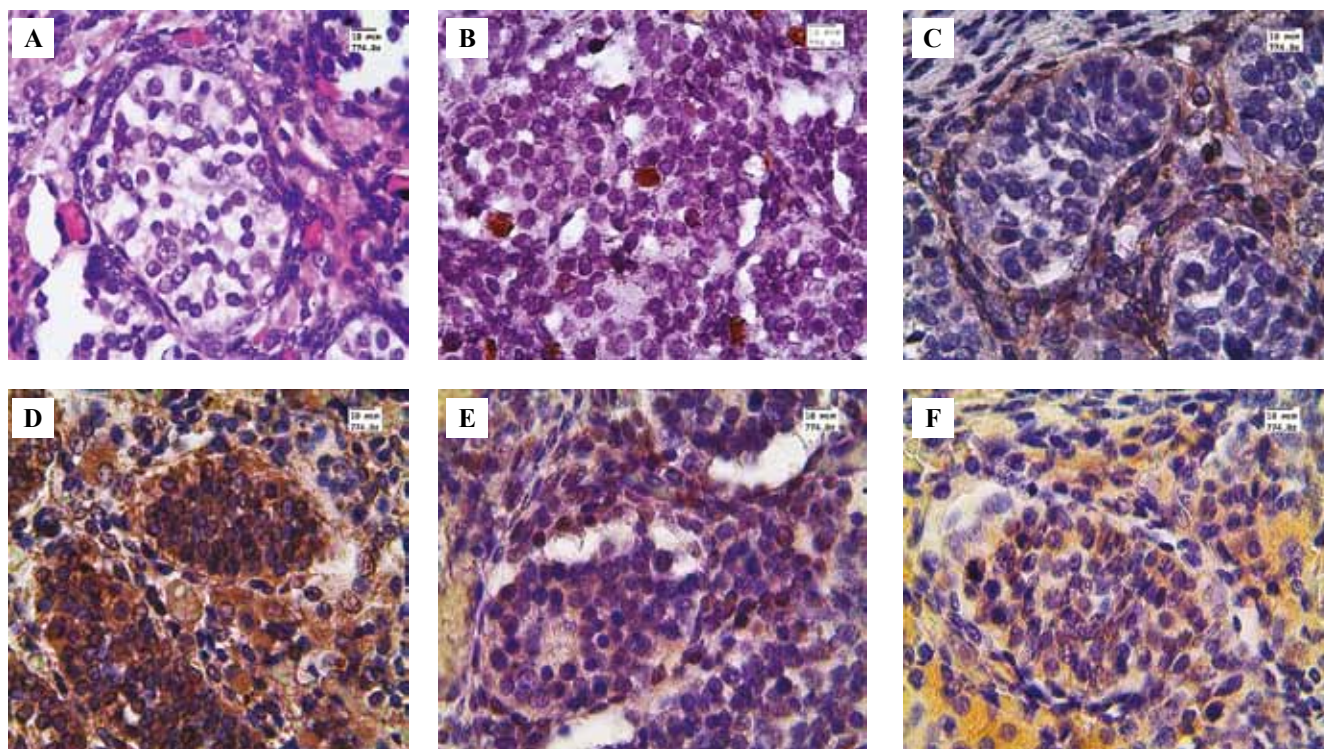


Рис. 3. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 26–29 недель гестации.

А – хаотичное расположение половых клеток эпителио-сперматогенного слоя. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 774$. В – рассеянная экспрессия маркера пролиферации Ki 67. С – умеренная перитубулярная реакция с маркером апоптоза Bcl 2. D – выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – умеренная экспрессия андрогенового рецептора AR. F – слабая экспрессия FGF в интерстиции и эпителии канальцев. В–F – ИГХ окрашивание, $\times 774$

Fig. 3. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 26–29.

A – chaotic arrangement of cells in the tubules. H&E stain, $\times 774$. B – diffuse expression of the proliferation marker Ki-67. C – moderate peritubular reaction with apoptosis marker Bcl 2. D – moderate diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – moderate expression of the androgen receptor AR. F – low expression of FGF in the interstitium and epithelium of the tubules. B–F – IHC assay, $\times 774$

плодов с хронической гипоксией увеличилось в 94 раза (табл. 4). Наблюдалась умеренная (++) и слабая (+) экспрессия андрогенового рецептора в эпителии канальцев в интерстициальных и перитубулярных миоидных клетках. В некоторых полях зрения отмечалась ядерная экспрессия в перитубулярных клетках (рис. 3 E). Доля экспрессирующих клеток в группах острой и хронической гипоксии составляла 50% и 40%, соответственно. Экспрессия FGF была умеренной (++) и слабой (+) в интерстициальных эндокриноцитах и в клетках эпителио-сперматогенного слоя в обеих группах (рис. 3 F, табл. 4).

Гистологические особенности яичек плодов 30–40 недель гестации

В 30–40 недель гестации в яичках плодов основной группы также преобладал стромальный компонент. Просветы в канальцах не определялись, клетки располагались хаотично (рис. 4 A). Интерстициальная ткань была хорошо васкуляризована ($Me=22$ в поле зрения при $\times 774$).

Отмечалась умеренная (+) экспрессия маркера пролиферации в единичных клетках эпителио-сперматогенного слоя, в строме (рис. 4 B). По сравнению с группой плодов, умерших от острой гипоксии, в группе плодов с хронической гипоксией доля клеток, экспрессирующих Ki 67, уменьшилась почти в 3 раза (30% и 11%, соответственно). Экспрессия маркера апоптоза наблюдалась преимущественно в интерстициальных эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках и была слабо выраженной (+) (рис. 4 C). Экспрессия эстрогенового рецептора была выраженной (+++) в эпителии канальцев, умеренной (++) в интерстиции (рис. 4 D). Количество экспрессирующих клеток в группе плодов с хронической гипоксией составляло 98%, в группе с острой – 4%. Экспрессия рецепторов андрогена была слабо выражена (+) как в интерстиции, так и в эпителии канальцев (рис. 4 E). Экспрессия FGF была слабой (+) и наблюдалась в отдельных клетках (рис. 4 F, табл. 4). Морфометрические показатели оценки яичек плодов 30–40 недель гестации в основной группе и в группе сравнения приведены в таблице 3.

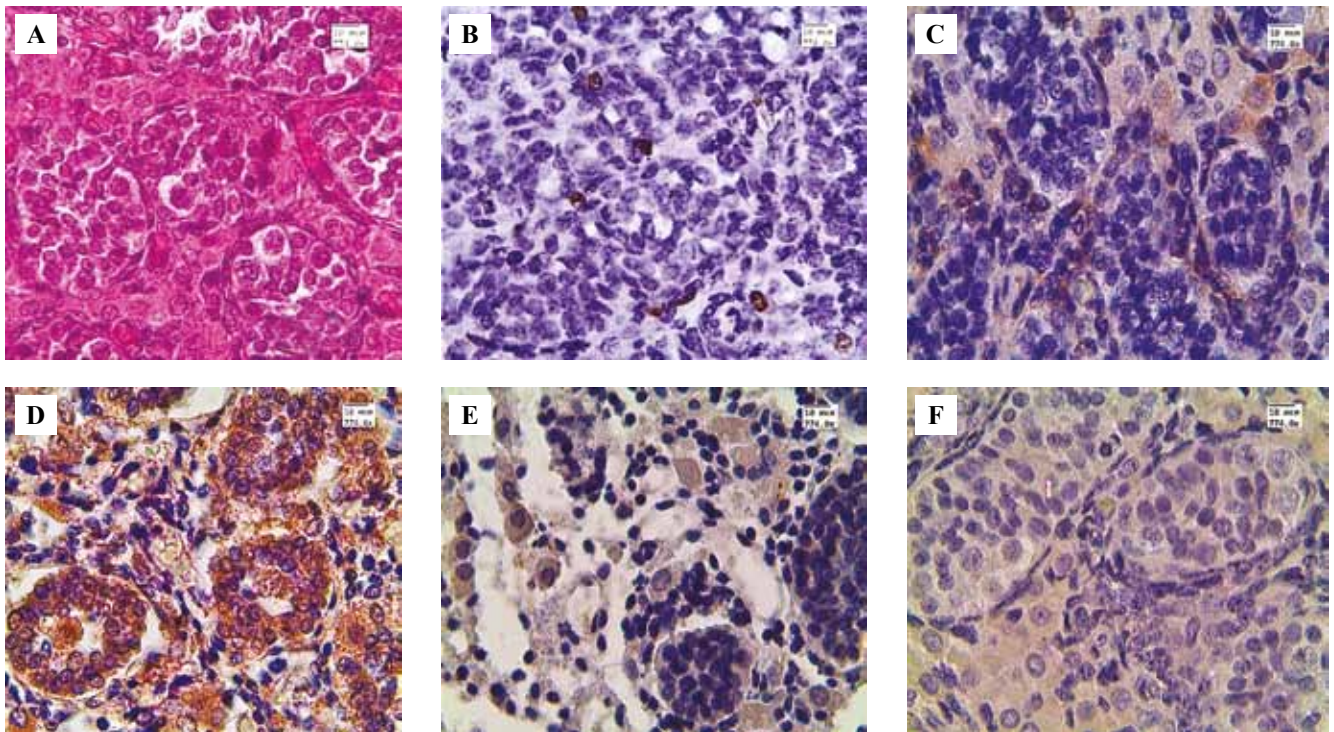


Рис. 4. Ткань яичка плода с внутриутробной хронической гипоксией в период 30–40 недель гестации.

А – атрофия канальцев. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 774$. В – экспрессия маркера пролиферации (Ki 67) в отдельных клетках. С – слабая перитубулярная и интерстициальная реакция с маркером апоптоза Bcl 2.

D – выраженная диффузная экспрессия эстрогенового рецептора ER. E – слабая экспрессия андрогенового рецептора AR. F – отсутствие экспрессии FGF. B–F – ИГХ окрашивание, $\times 774$

Fig. 4. Testicular tissue with chronic hypoxia at gestation weeks 30–40.

A – tubular atrophy. H&E stain, $\times 774$. B – expression of the proliferation marker Ki-67 in single cells. C – low peritubular and interstitial reactions with apoptosis marker Bcl 2.

D – pronounced diffuse expression of the estrogen receptor ER. E – low expression of the androgen receptor. F – absence of expression of FGF. B–F – IHC assay, $\times 774$

Обсуждение

В ранее проведенных работах [9, 10] мы изучали морфологию ткани яичек плода при экспериментальной хронической гипоксии у лабораторных животных и на секционном материале у плодов человека со сроками гестации 19–29 недель, а также оценивали экспрессию васкулоэндотелиального фактора. В настоящей работе мы расширили число используемых для ИГХ исследования антител и добавили еще одну группу – яички плодов при сроке гестации 30–40 недель.

При сопоставлении данных роста, массы тела плодов при острой и хронической гипоксии нами отмечено, что во всех подгруппах с увеличением срока гестации росто-весовые показатели закономерно увеличиваются (табл. 1). Надо отметить, что в группах острой и хронической гипоксии в сроки гестации 19–22 недели и 23–25 недель плоды имели практически одинаковые росто-весовые показатели, разница по массе стала появляться в группе 26–29 недель, но и она была статистически недостоверна. В период 30–40 недель гестации росто-весовые показатели плодов, умерших от внутриутробной хронической гипоксии, были достоверно ниже, чем в группе острой гипоксии.

По данным литературы, пролиферация клеток яичка происходит преимущественно в первом триместре беременности. В период с 16-й по 40-ю неделю наблюдаются немногочисленные пролиферирующие клетки, причем располагаются они преимущественно в интерстиции [11].

В нашем исследовании в группе плодов с хронической гипоксией экспрессия маркера пролиферации в тканях яичка во все сроки гестации была ниже, чем в группе плодов, умерших от острой асфиксии. В сроки гестации 30–40 недель отмечали самые низкие показатели пролиферативной активности, в то время как в группе плодов с острой гипоксией уровень пролиферативной активности клеток в яичке практически не изменялся.

Экспрессия Bcl 2 в яичке изменяется в зависимости от срока гестации. В первом триместре она наблюдается в sustentоцитах и интерстициальных эндокриноцитах, во втором триместре – в интерстициальных эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках, в третьем триместре не обнаруживается. В работе [11] было показано, что экспрессия маркера Bcl 2 в человеческом фетальном семеннике наблюдается только

при значительных изменениях в морфогенезе яичка. Считается, что Bcl 2, являясь ингибитором апоптоза, защищает соматические клетки от апоптоза во время их пролиферации и созревания [11].

В нашем исследовании экспрессия Bcl 2 при хронической гипоксии была слабой (+) и умеренно выраженной (++) во все периоды гестации. Помимо интерстиция и перитубулярных миоидных клеток она наблюдалась и в единичных половых клетках. Количество экспрессирующих клеток постоянно снижалось, но в группе плодов с хронической гипоксией оно было выше, чем у плодов с острой гипоксией. Так, при сроке гестации 19–22 недели экспрессировал 21% клеток (в группе плодов с острой гипоксией – 11%), а в 30–40 недель доля экспрессирующих клеток уменьшалась до 11% (в группе плодов с острой гипоксией – 7%).

Эстрогеновый рецептор является аутокринным и паракринным регулятором развития яичка и играет важную роль, особенно в период максимальной восприимчивости яичка к различного рода нарушениям.

Проведенное исследование показало, что при хронической гипоксии наблюдается выраженная (++++) диффузная экспрессия эстрогенового рецептора во все сроки гестации. Количество экспрессирующих клеток в группе плодов с хронической гипоксией значительно превышало такие же показатели в группе плодов с острой гипоксией. Полученный результат несколько отличается от данных некоторых зарубежных авторов [12, 13], согласно которым эстрогеновый рецептор экспрессируется в ткани яичка в суспендоцитах, половых клетках и интерстициальных эндокриноцитах и имеет окно экспрессии с 13-й по 22–24-ю неделю гестации.

Андрогены являются наиболее важными гормонами, контролирующими маскулинизацию репродуктивного тракта и гениталий. В период внутриутробного развития отмечается постепенное нарастание концентрации половых гормонов, достигающих максимального уровня к концу второго триместра с последующим прогрессивным снижением до момента рождения. По данным литературы [14, 15], в эмбриональном и раннем постнатальном периодах в яичке активно секретируют андрогены интерстициальные эндокриноциты.

В нашем исследовании в яичках плодов в условиях хронической гипоксии экспрессия андрогенового рецептора была умеренной (++) и слабой (+) в эпителиальных клетках, эндокриноцитах и перитубулярных миоидных клетках.

FGF классически известны как гормональные факторы, чаще всего они являются митогенами, и недавние исследования показали [6], что FGF играют ключевую роль в регуляции роста и развития некоторых репродуктивных органов, включая яичко. Доказано, что FGF имеют особое значение для нормального эмбриогенеза и любые отклонения от нормы в их содержании ведут к ряду дефектов в развитии. В нашем исследовании наблюдалось постепенное увеличение экспрессии FGF

с резким снижением процента экспрессирующих клеток в период 30–40 недель гестации. Следует отметить, что схожая динамика наблюдалась и в группе плодов, умерших от острой гипоксии.

Заключение

Хроническая гипоксия в процессе формирования яичек в антенатальном периоде приводит к негармоничному развитию всех его структур. В результате длительного кислородного голодания в ткани яичек развиваются компенсаторные механизмы, проявляющиеся в виде экспрессии ингибитора апоптоза. Однако гипоксия нарушает процессы пролиферации и снижает функциональную активность интерстициальных эндокриноцитов, что подтверждается слабой экспрессией андрогенового рецептора и выраженной экспрессией эстрогенового рецептора на протяжении всех периодов гестации. Такие изменения в морфогенезе яичек могут привести к снижению фертильности в будущем.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Т.В. Палатова, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, О.С. Годяге.

Сбор и обработка материала – Т.В. Палатова, С.С. Пахомий, А.В. Медведева.

Написание текста – Т.В. Палатова, Е.С. Воронина.

Редактирование – Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – T.V. Palatova, G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya. O. S. Godage.

Collected the data and performed the analysis – T.V. Palatova, S.S. Pahomy, A.V. Medvedeva.

Wrote the paper – T.V. Palatova, E.S. Voronina.

Edited the manuscript – G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya.

Литература/References

1. *Kulchenko N.G., Demyashkin G.A.* Морфологические изменения в ткани яичка при бесплодии. Андрология и генитальная хирургия. 2016;17(3):38–42. DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42.
Kulchenko NG, Demyashkin GA. Morphological changes in testicular tissue in infertility. *Andrology and Genital Surgery.* 2016;17(3):38–42 (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42.
2. *Ivell R, Anand-Ivell R, Morley SD.* Endocrinology of the fetal testis. In: M. Simoni, I. Huhtaniemi (eds.). *Endocrinology of the testis and male reproduction.* Endocrinology. Springer, Cham, 2017. P. 1–28. DOI: 10.1007/978-3-319-29456-8_7-1.
3. *Shima Y.* Development of fetal and adult Leydig cells. *Reprod Med Biol.* 2019;18(4):323–30. DOI: 10.1002/rmb2.12287.
4. *Burek M, Duda M, Knapczyk K, Kozirowski M, Słomczyńska M.* Tissue-specific distribution of the androgen receptor (AR) in the porcine fetus. *Acta Histochem.* 2007;109(5):358–65. DOI: 10.1016/j.acthis.2007.03.003.
5. *O'Shaughnessy PJ, Verhoeven G, De Gendt K, Monteiro A, Abel MH.* Direct action through the Sertoli cells is essential

- for androgen stimulation of spermatogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(5):2343–8. DOI: 10.1210/en.2009-1333.
6. Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. The roles of fibroblast growth factors in the testicular development and tumor. *J Diabetes Res*. 2013;2013:489095. DOI: 10.1155/2013/489095.
 7. Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T et al. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J Bone Miner Res*. 2014;29(7):1627–38. DOI: 10.1002/jbmr.2186.
 8. Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB et al. The hypoxic testicle: Physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:929285. DOI: 10.1155/2012/929285.
 9. Palatova TV, Bucharskaya AB, Medvedeva AV, Voronina ES, Maslyakova GN. Influence of chronic intrauterine hypoxia on development of testicles of newborns. *Russian Open Medical Journal*. 2018;7(2):e0201. DOI: 10.15275/rusomj.2018.0201.
 10. Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Медведева А.В., Воронина Е.С. Морфологические особенности яичек плода при хронической внутриутробной гипоксии на разных сроках гестации. *Архив патологии*. 2018;80(4):21–26. DOI: 10.17116/patol201880421.
Palatova TV, Maslyakova GN, Bucharskaya AB, Medvedeva AV, Voronina ES. Morphological characteristics of fetal testes in chronic intrauterine hypoxia in different gestation periods. *Arkhiv Patologii = Archive of Pathology*. 2018;80(4):21–26 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201880421.
 11. Ketola I, Toppari J, Vaskivuo T, Herva R, Tapanainen JS, Heikinheimo M. Transcription factor GATA-6, cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins Bcl 2 and Bax in human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1858–65. DOI: 10.1210/jc.2002-021647.
 12. Boukari K, Ciampi ML, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M, Meduri G. Human fetal testis: Source of estrogen and target of estrogen action. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1885–92. DOI: 10.1093/humrep/dem091.
 13. Filipiak E, Suliborska D, Laszczynska M, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Marchlewska et al. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;50(3):340–5. DOI: 10.5603/19743.
 14. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech*. 2009;72(11):787–95. DOI: 10.1002/jemt.20754.
 15. Merlet J, Moreau E, Habert R, Racine C. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. *Cell Cycle*. 2007;6(18):2258–62. DOI: 10.4161/cc.6.18.4654.

Информация об авторах

Татьяна Васильевна Палатова – ассистент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Алла Борисовна Бучарская – кандидат биологических наук, руководитель Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Елена Сергеевна Воронина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Анна Валентиновна Медведева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Светлана Сергеевна Пахомий – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Ольга Сергеевна Годяге – аспирант кафедры патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Галина Никифоровна Маслякова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Author information

Tatiana V. Palatova – Assistant, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-3889-5052>

Alla B. Bucharskaya – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Centre of Collective Use, Research Institute of Fundamental and Clinic Uronephrology, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-0503-6486>

Elena S. Voronina – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-4954-4784>

Anna V. Medvedeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-6548-0955>

Svetlana S. Pahomy – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-8540-6901>

Olga S. Godage – Post-graduate Student, Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-8234-7010>

Galina N. Maslyakova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, V.I. Ravumovsky Saratov State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-8834-1536>