

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

УДК: 616.69-008.6

ГРНТИ: 76.03.35: Медицинская гистология

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА МАТЕРИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПОТОМСТВА

Брюхин Геннадий Васильевич

Доктор мед. наук., проф.,
зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии,
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России,
г. Челябинск.

Антонов Сергей Дмитриевич

соискатель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России,
г. Челябинск.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск

Адрес: 454092, Российская Федерация, Уральский федеральный округ,
Челябинская область, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

THE EFFECT OF EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES OF THE MOTHER ON THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF SPERM OF OFFSPRING

Gennady V. Bryukhin

Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of the Department of Histology, Cytology and Embriology
South-Ural State Medical University,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Chelyabinsk

Sergei D. Antonov

aspirant of the Department of Histology, Cytology and Embriology,
South-Ural State Medical University,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Chelyabinsk

FSBEIHE "South-Ural State Medical University"
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk
Address: 64 Vorovskogo Str., Chelyabinsk, Russian Federation, 454092.

Аннотация

Цель: анализ жизнеспособности сперматозоидов половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Методы: Исследования проведены на белых лабораторных крысах линии «Вистар», у которых моделировали сахарный диабет 1 типа, и их половозрелом потомстве. Проведен сравнительный анализ суммарного содержания сперматозоидов в эпидидимальной суспензии, а также их субпопуляционного состава по жизнеспособности, с последующим определением индекса двигательной активности, произведена оценка содержания атипичных форм сперматозоидов.

Результаты: Установлено, что у потомства подопытных животных имеет место снижение суммарного содержания сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной суспензии. При этом происходит увеличение числа атипичных форм и угнетение жизнеспособности сперматозоидов, о чем свидетельствует снижение их двигательной активности.

Выводы: полученные результаты убедительно свидетельствуют, что у матерей с экспериментальным сахарным диабетом рождается потомство с нарушением морфофункционального становления мужской репродуктивной системы.

Abstract

Aims: analysis of the sperm viability of mature offspring of female rats with experimental type 1 diabetes.

Materials and methods: The studies were conducted on white laboratory rats (Wistar), in which type 1 diabetes was simulated, and their mature offspring. A comparative analysis of the total sperm count in the

epididymal suspension, as well as their subpopulation composition by viability, with the subsequent determination of the index of motor activity, the content of atypical forms of sperm is estimated.

Results: It was found that the offspring of experimental animals has a decrease in the total sperm count in 1 ml of epididymal suspension. In this case, an increase in the number of atypical forms and inhibition of the viability of spermatozoa occurs, as evidenced by a decrease in their motor activity.

Conclusions: The results obtained convincingly indicate that offspring of mothers with experimental diabetes mellitus are born with a violation of the morphofunctional formation of the male reproductive system.

Ключевые слова: сахарный диабет, эксперимент, сперматозоиды, жизнеспособность.

Keywords: diabetes mellitus, animal experimentation, spermatozoa, cell survival

АКТУАЛЬНОСТЬ

Актуальность настоящего исследования обусловлена выраженным повсеместным ростом сахарного диабета, в том числе у лиц фертильного возраста [1]. Так по данным статистики, только в России ежегодно заболевает сахарным диабетом около 100 тысяч человек [2]. Несмотря на усилия специалистов, инвалидизация и смертность больных сахарным диабетом остается высокой, что обусловлено, прежде всего, недостаточным уровнем знаний тонких патогенетических механизмов данного заболевания [3]. При этом установлено, что у женщин с сахарным диабетом часто рождаются дети с различными дефектами развития, в том числе сердечно-сосудистой, нервной и эндокринной систем [4]. Практически отсутствуют данные, касающиеся особенностей морфофункционального становления мужской репродуктивной системы у потомства матерей с сахарным диабетом.

Цель

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явился анализ жизнеспособности сперматозоидов половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Методы

Работа выполнена на белых лабораторных крысах линии «Вистар». Для достижения поставленной цели у взрослых половозрелых крыс (самок) до беременности моделировали сахарный диабет 1 типа по общепринятой методике с использованием стрептозотоцина [5], который вводился животным внутривентриально трижды с интервалом 7 дней (по 2.5 мг на 100 г массы в первую и в третью недели и 2 мг на 100 г массы во вторую неделю). Всего за весь курс 10 лабораторных животных с массой от 230 до 256 г получали по 17 мг стрептозотоцина, под влиянием которого у лабораторных животных развивался сахарный диабет, о чем свидетельствовал постоянный повышенный уровень содержания сахара в крови (32.56 ± 2.44 ммоль/л), который сохранялся на протяжении, как минимум, трех месяцев. Подсадка к интактным самцам для спаривания проводилась через 1 неделю после последнего введения стрептозотоцина. В результате рождались подопытные крысята, эту группу составили 10 крысят из 10 пометов. Через неделю после последней инъекции самок подсаживали к интактным самцам.

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с «Европейской

конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986 г. Экспериментальных животных содержали в стандартных условиях вивария ЮУГМУ. Эвтаназия животных проводилась методом декапитации под эфирным наркозом.

Объектом исследования явилось половозрелое потомство (70-ти дневное) самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, разрезая его вдоль в среде дозированного количества 5% раствора глюкозы (в объеме 1 мл), предварительно подогретого до 37°C . Затем отрезком отмытой резиновой трубки сперматозоиды из эпидидимиса активно перемещали в раствор в течение 2 минут [6]. Затем в камере Горяева подсчитывали количество сперматозоидов с учетом характера их подвижности. Подвижность оценивали по общепринятой 4-х бальной системе: 0 – неподвижные (погибшие), 1 – «дергающиеся» (колебательное, местное движение, когда имеется движение хвоста, но не происходит перемещение сперматозоида, 2 – слабоподвижные (манежное или круговое движение, при котором сперматозоиды вращаются вокруг своей головки или по небольшому кругу), 3 – прогрессивно подвижные (прямолинейное поступательное движение со спиральным вращением вокруг своей оси) сперматозоиды. Подсчет проводился в течение 1 часа через каждые 15 минут, а затем через 30 мин до 240 минуты включительно [7].

Для оценки патологических форм сперматозоидов часть полученной суспензии смешивали с 1% раствором эозина Y в соотношении 1:10, затем спустя 30 минут готовили мазки, которые после просушивания на воздухе фиксировали метиловым спиртом и подвергали микроскопии [8]. Подсчитывалось на 200 клеток процентное содержание сперматозоидов с дефектами головки, шейки, средней части и хвостика [9].

Кроме того, определяли суммарное содержание сперматозоидов в единице объема (1мл) эпидидимальной суспензии [10].

Все полученные результаты обработаны с использованием программного пакета Statistica v.6,0 («Statsoft Inc.») и представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки. Учитывая небольшой количественный состав групп экспериментальных животных, для оценки достоверности использовались непараметрические

методы анализа: порядковые признаки между двумя группами – критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми изменения считали при $p < 0.05$.

Результаты

Прежде всего, нами установлено, что у подопытных животных имеет место достоверное снижение суммарного содержания сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной суспензии. Так, если у интактных животных исследуемый показатель составил $137.5 \pm 6.2 \times 10^6$, то у подопытных крысят он снизился на 28.4% и составил всего $98.5 \pm 6.35 \times 10^6$. Обращает на себя внимание, что на фоне снижения уровня концентрации сперматозоидов у подопытных животных отмечается увеличение числа патологических форм сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной взвеси ($14.5 \pm 1.09 \times 10^6$) по сравнению с группой контроля ($4.8 \pm 0.80 \times 10^6$).

О жизнеспособности эпидидимальных сперматозоидов также судили по характеру их двигательной активности, которую оценивали по

общепринятой методике 4-х бальной оценки, с последующим определением индекса подвижности сперматозоидов, отражающего отношение фертильных половых клеток к нефертильным в динамике. Фракцию фертильных сперматозоидов составляют прогрессивно подвижные и слабоподвижные клетки. Установлено, что у подопытных самцов содержание прогрессивно подвижных сперматозоидов на 1-ой минуте наблюдения снижено на 18,5% ($42.6 \pm 1.53\%$) по сравнению с контрольными животными ($52.3 \pm 2.39\%$). В процессе наблюдения количество прогрессивно подвижных сперматозоидов у экспериментальных животных контрольной и опытной групп постепенно снижается (рис. 1). При этом у интактных крысят прогрессивно подвижные сперматозоиды сохраняются до 120 минуты, в то время как у подопытных животных эта фракция сперматозоидов исчезает уже на 60-ой минуте наблюдения.

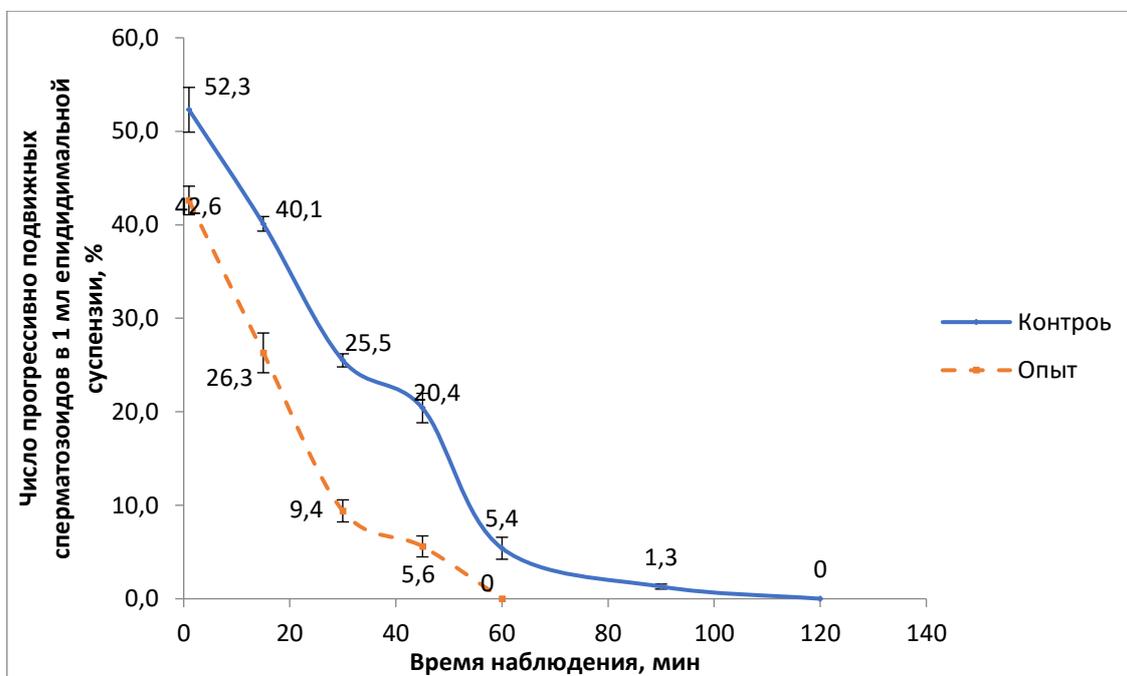


Рис. 1. Динамика содержания прогрессивно подвижных сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной взвеси ($p < 0.05$).

При этом происходит изменение фракции слабоподвижных сперматозоидов. Как видно из таблицы №1, на 1-ой минуте наблюдения содержание этой группы сперматозоидов у животных контрольной и опытной групп практически не отличалось. В процессе наблюдения происходит постепенное уменьшение числа слабоподвижных половых клеток у всех экспериментальных животных. Обращает на себя внимание, что у контрольных животных эта

фракция сперматозоидов сохраняется до 120 минуты, в то время как у подопытных самцов – только до 60 минуты.

«Дергающиеся» и неподвижные сперматозоиды составляют нефертильную фракцию. Как видно из таблицы №2, на всех сроках исследования содержание «дергающихся» сперматозоидов у подопытных животных превышает таковое в контроле.

Таблица №1

Содержание слабоподвижных сперматозоидов экспериментальных животных (%) (M±m)

Эксперим. группа	Время исследования, мин						
	1	15	30	45	60	90	120
К	31.9 ± 2.0	37.6 ± 0.6	34.4 ± 1.1	25.7 ± 1.7	21.3 ± 1.2	2.0 ± 0.4	1.6 ± 0.3
О	29.3 ± 1.5	35.3 ± 0.8 ^x	26.4 ± 0.9 ^x	22.6 ± 1.5	4.0 ± 1.0 ^x	-	-

x – результаты статистически значимы по сравнению с контролем (p < 0.05);

Таблица №2

Содержание дёргающихся и неподвижных сперматозоидов экспериментальных животных (%) (M±m)

Эксперим. группа	Время исследования, мин								
	1	15	30	45	60	90	120	150	180
К (дёргаю-щиеся)	11.9 ± 0.9	10.0 ± 0.6	14.6 ± 0.6	27.9 ± 1.4	24.2 ± 1.3	8.0 ± 1.0	7.4 ± 1.2	2.4 ± 0.6	-
О (дёргаю-щиеся)	13.0 ± 1.8	21.5 ± 1.9 ^x	26.7 ± 1.6 ^x	27.7 ± 1.8	42.5 ± 1.5 ^x	15.5 ± 2.3 ^x	-	-	-
К(непод-вижные)	4.0 ± 0.6	12.3 ± 0.4	25.5 ± 0.9	25.9 ± 1.5	49.2 ± 1.6	88.7 ± 1.0	91.1 ± 1.2	97.6 ± 0.6	100
О(непод-вижные)	14.9 ± 1.2 ^x	16.9 ± 0.9 ^x	37.4 ± 1.6 ^x	44.1 ± 1.5 ^x	53.5 ± 1.5	84.5 ± 2.3	100 ^x	-	-

x – результаты статистически значимы по сравнению с контролем (p < 0.05);

Особый интерес представляют данные, свидетельствующие об изменении неподвижных эпидидимальных сперматозоидов. Как видно из таблицы №2, уже на 1-ой минуте наблюдения у подопытных животных содержание неподвижных сперматозоидов в несколько раз превышает таковое в контроле. В процессе наблюдения количество неподвижных сперматозоидов у экспериментальных животных контрольной и опытной групп постепенно увеличивается по мере уменьшения численности половых клеток других

фракций. Если у интактных самцов подвижные сперматозоиды наблюдаются до 150 минуты, то у подопытных крысят только до 90 минуты. При этом обращает на себя внимание тот факт, что у подопытных животных фертильные сперматозоиды (прогрессивно подвижные и слабоподвижные) выявляются в эпидидимальной суспензии только до 60-ой минуты, в то время как у животных контрольной группы эта популяция половых клеток наблюдается до 120-ой минуты.

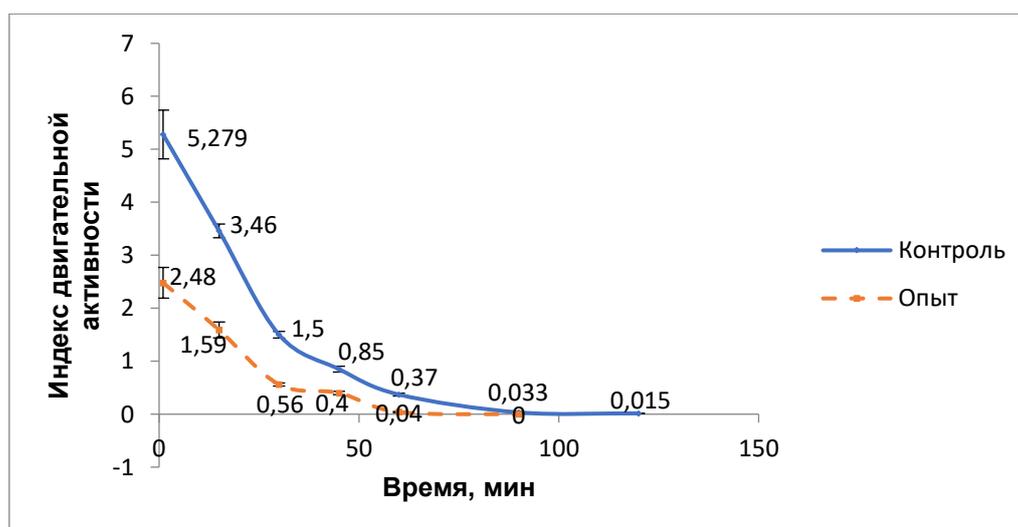


Рис. 2. Индекс двигательной активности сперматозоидов экспериментальных животных (p < 0.05)

Изменение содержания фертильных и нефертильных сперматозоидов у подопытных животных обусловило на всех сроках исследования снижение индекса подвижности половых клеток (рис. 2). У интактных животных индекс подвижности сперматозоидов постепенно

снижается с 5,279 на 1-ой минуте до 0.015 на 120-ой минуте наблюдения. У подопытных самцов индекс подвижности клеток на 1-ой минуте составил всего 2.481, а затем исследуемый показатель постепенно уменьшается до 0.041 на 60-ой минуте. При этом на всех сроках исследования

индекс подвижности сперматозоидов у подопытных животных существенно был снижен по сравнению с контролем.

Обсуждение

Результаты исследования убедительно свидетельствуют, что у матерей с экспериментальным сахарным диабетом рождается потомство с нарушением морфофункционального становления мужской репродуктивной системы, о чем свидетельствует как уменьшение суммарного содержания сперматозоидов, в том числе фертильной фракции, так и угнетение двигательной активности половых клеток.

Известно, что гипергликемия, развивающаяся при поражении бета-клеток островков Лангерганса, в конечном итоге обуславливает нарушения внутрисосудистой гемодинамики различных органов и систем, что, в свою очередь, во время беременности приводит к развитию гипоксии плода [2]. В то же время, глюкоза и лактат служат основными энергетическими субстратами для зародышевых клеток. Однако способность герминативных клеток использовать глюкозу очень низкая, а лактат рассматривается как основной энергетический субстрат и является ведущим фактором выживаемости для этих клеток в условиях гипоксии [11].

Вместе с тем, согласно данным литературы, при гипергликемии матери, обусловленной экспериментальным сахарным диабетом, глюкоза, в избытке проникая через плаценту в кровь плода [12], вызывает гиперплазию бета-клеточного аппарата поджелудочной железы. Развивающийся гиперинсулинизм плода, в конечном итоге, приводит к развитию гипогликемии, являющейся одним из наиболее серьезных осложнений антенатального периода, обуславливающим нарушения процессов гистогенеза, в том числе пролиферации и дифференцировки тканевых элементов семенников.

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют констатировать, что сахарный диабет I типа матери обуславливает у потомства угнетение жизнеспособности и двигательной активности сперматозоидов и, как следствие, приводит к увеличению содержания нефертильных фракций мужских половых клеток и, напротив, уменьшению числа фертильных форм сперматозоидов, что не может не сказаться на фертильности животных.

Дополнительная информация.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Список литературы

1. Колуэлл Дж.А. Сахарный диабет: новое в лечении и профилактике. – М.: Бином: Лаборатория знаний; 2007. [Koluell Dzh.A. Sakharnyi diabet: novoe v lechenii i profilaktike. Moscow: Binom: Laboratoriya znani; 2007. (In Russ.)].

2. Сахарный диабет : острые и хронические осложнения / Под ред. Дедова И.И., Шестаковой М.В. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011. [Sakharnyy diabet : ostrye i khronicheskie oslozhneniya / Ed by Dedov I.I., Shestakova M.V. Moscow: ООО «Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2011. (In Russ.)]

3. Питер-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет: диагностика и лечение. – М.: Практика; 2008. [Piter-Kharmel E., Matur R. Sakharnyi diabet: diagnostika i lechenie. Moscow : Praktika; 2008. (In Russ.)]

4. Григорян О.Р., Андреева Е.Н. Сахарный диабет и беременность. В кн.: Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. Дедова И.И., Шестаковой М.В. – М.: ООО Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011. с. 733-767. [Grigoryan O.R., Andreeva E.N. Sakharnyi diabet i beremennost'. In: Sakharnyi diabet: diagnostika, lechenie, profilaktika / Ed by Dedov I.I., Shestakova M.V. Moscow: ООО Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2011. p.733-767. (In Russ.)]

5. Закирьянов А.Р., Плехотный М.А., Онищенко Н.А. и др. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2007; 4: 21-25. [Zakirianov A.R., Plakhotny M.A., Onischenko N.A. et al. Diabetic complications in rats in long-term modeling of type I diabetes mellitus. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2007; (4): 21-25. (In Russ.)].

6. Луцкий Д.Л., Николаев А.А. Морфологическое исследование эякулята: методическое пособие. – Астрахань: Издательство АГМА; 1999. [Lutskiy D.L., Nikolaev A.A. Morfologicheskoe issledovanie eyakulyata: metodicheskoe posobie. Astrakhan': Izdatel'stvo AGMA; 1999. (In Russ.)]

7. Молнар Е. Общая сперматология. Будапешт: Издание АН Венгрии; 1969. [Molnar E. Obshchaya spermatologiya. Budapesht : Izdanie AN Vengrii; 1969. (In Russ.)]

8. Wyrobek A.J., Bruce W.R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72: 4425-4429. doi: 10.1073/pnas.72.11.4425

9. Kuriyama K., Kitamura T., Yokoi R.M. et al. Hayashi Evaluation of testicular toxicity and sperm morphology in rats treated with methyl methanesulphonate (MMS). *Reprod Dev*. 2004; 50: 455-461. doi: 10.1262/jrd.16085

10. Тиктинский О.Л., Михайличенко В.В. Андрология. – СПб.: Медиа-Пресс; 1999. [Tiktinskiy O.L., Mikhailichenko V.V. Andrologiya. Saint-Petersburg: Media Press; 1999. (In Russ.)]

11. Шевантаева О.Н., Косюга Ю.И. Влияние острой гипобарической гипоксии на сперматогенез и уровень лактата в ткани семенников самцов белых крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; (1): 24-26. [Shevantaeva

O.N., Kosyuga Yu.I. Effect of acute hypobaric hypoxia on spermatogenesis and lactate concentration in testicular tissue of male albino rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2006; (1): 24-26. (In Russ.)]

12. Капустин Р.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н. Патология плаценты и плода

при сахарном диабете. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2018; 67 (6): 79-92. doi: 10.17816/JOWD67679-92 [Капустин Р.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н. Патология плаценты и плода в диабетическом диабете. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2018; 67 (6): 79-92. (In Russ.) doi: 10.17816/JOWD67679-92]

ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЬНЫХ АЛГОРИТМОВ ЛЕЧЕНИЯ В ЕЖЕДНЕВНОЙ ПРАКТИКЕ ВРАЧА СТОМАТОЛОГА ЭНДОДОНТИСТА.

Братусь Андрей Евгеньевич
аспирант

Кузнецов Сергей Владимирович
д.м.н, профессор

кафедры терапевтической стоматологии Института Стоматологии им. Е.В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва

THE PRINCIPLES OF USING SPECIFIC TREATMENT PROTOCOLS IN THE DAILY PRACTICE OF AN ENDODONTIST.

Bratus Andrey Evgenyevich
Postgraduate student

Kuznetsov Sergey Vladimirovich
PhD, Professor

Department of therapeutic dentistry of Institute of Dentistry named after E.V.Borovsky Sechenov First Moscow State University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

DOI: [10.31618/nas.2413-5291.2020.1.55.211](https://doi.org/10.31618/nas.2413-5291.2020.1.55.211)

Abstract

The main goals in dental practice are the high quality of the work, reduction of the risk of medical errors and effective diagnosis and treatment of oral tissues diseases; the whole multilevel system of medical care is willing to increase these indicators. Therefore, it is important to find ways to improve and maintain the dental care for the population [1].

One of these ways is the implementation of dental care standards. These standards are developed by the Dental Association of Russia and updated in 2018. There are specific algorithms and clinical recommendations for the treatment of patients with pulp and periapical tissue diseases.

Key words: dentistry; specific algorithms; clinical recommendations; pulp diseases; diseases of periapical tissues; quality of medical care.

Aim of research: to investigate specific algorithms (clinical recommendations) for the treatment of pulp and periapical tissue diseases approved by Dental Association of Russia, in Moscow dental clinics.

Materials and methods: This research was carried out in private clinics and state dental polyclinics. 176 specialists in therapeutic dentistry who work in Moscow and Moscow region took part in it.

Clinics, which are involved in the research, suggest medical care under various programs: compulsory medical insurance, voluntary medical insurance and commercial admission.

Anonymous survey was conducted on the basis of the electronic system Google Forms. The questionnaire consisted of 26 questions about stages of endodontic treatment and treatment protocol.

Results: According to the results of the survey, it was revealed that most of the doctors are familiarized with the clinical recommendations for the treatment of pulp and periapical tissue diseases published by the Dental Association of Russia, namely 68.4% of the

respondents. The data of the above answer to the question are characteristically compared with the answers to the question about carrying out an X-ray examination before starting endodontic dental treatment, since according to the treatment protocols approved by the Dental Association of Russia, this study should be mandatory.

Therefore, 56.2% of respondents always carry out a diagnostic X-ray procedures at the beginning of endodontic treatment, 12.3% before starting work, and 31.5% - if only they anticipate difficulties during treatment, and this approach does not feel right. The reason why dentists neglect the X-ray diagnostic method is that 41.9% of respondents think it is not essential, 19.4% do not have enough time for an appointment, 22.6% rely on their experience, 6.5% - because of patients' refusal, and only 9.7% of respondents do not conduct this diagnostic method if the X-ray equipment is out of service.

82.95% of doctors confirm that the management depends on patients' income, which impact on treatment protocols. Also, according to the results of