

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АМУРСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Абрамкин Эдуард Эдуардович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕМЕННИКОВ КРЫС
ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КУРСОВОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ**

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Макаров Игорь Юрьевич

Благовещенск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	13
1.1 Сперматогенез и его регуляция.	13
1.2 Бесплодие, обусловленное применением курсовой химиотерапии.	22
1.3 Дигидрокверцетин и его биологическая активность.	33
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	37
2.1 Общая характеристика экспериментальных животных и распределение их по группам.	37
2.2 Морфологические методы исследования.	40
2.2.1 Морфометрическая характеристика сперматогенного эпителия семенников крыс экспериментальных групп.	40
2.2.2 Морфометрическая характеристика эндокринного аппарата семенников крыс экспериментальных групп.	42
2.3 Иммуногистохимическое исследование апоптоза и пролиферативной активности сперматогенных клеток семенников крыс экспериментальных групп.	43
2.4 Иммуноферментный анализ плазмы крови крыс экспериментальных групп.	44
2.5 Цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс экспериментальных групп.	45
2.6 Методы статистической обработки.	46
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.	47
3.1 Морфофункциональное состояние семенников крыс после проведения химиотерапии на 7–14-е сутки.	47
3.1.1 Морфологическая характеристика семенников крыс экспериментальных групп.	47
3.1.2 Морфометрическая характеристика и иммуногистохимическое исследование сперматогенного эпителия крыс экспериментальных групп. ...	54

3.1.3 Морфометрическая характеристика эндокринного аппарата семенников крыс экспериментальных групп.	69
3.1.4 Иммуноферментный анализ плазмы крови крыс экспериментальных групп.	74
3.1.5 Цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс экспериментальных групп.	77
3.2 Морфофункциональное состояние семенников крыс после проведения химиотерапии на 21–35-е сутки.	88
3.2.1 Морфологическая характеристика семенников крыс экспериментальных групп.	88
3.2.2 Морфометрическая характеристика и иммуногистохимическое исследование сперматогенного эпителия крыс экспериментальных групп. . .	91
3.2.3 Морфометрическая характеристика эндокринного аппарата семенников крыс экспериментальных групп.	104
3.2.4 Иммуноферментный анализ плазмы крови крыс экспериментальных групп.	109
3.2.5 Цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс экспериментальных групп.	112
3.3 Корреляционный анализ.	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	130
ВЫВОДЫ.	142
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	144
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	147
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Согласно статистике ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России, за последние годы отмечается увеличение частоты заболеваемости онкологическими новообразованиями как среди взрослых, так и среди детей. В среднем за год диагноз «злокачественное новообразование» выставляют 10 млн человек, в день – 28 тысячам, из которых 1 600 – россияне. Так в 2017 году по стране зафиксировано 3,63 млн случаев онкологических заболеваний, в 2018 году – 3,76 млн онкобольных, в 2019 году было выявлено 640 тыс. новых случаев злокачественных новообразований, ввиду чего общая численность больных, состоящих на учёте у онкологов, составила 3,92 млн пациентов [60]. Заболеваемость раком у женского населения России приходится в первую очередь на опухолевые новообразования молочных желёз. Многие связывают это с высокой чувствительностью эпителия молочной железы к эстрогену. У мужского населения больший процент приходится на бронхиальные онкологические заболевания. В первую очередь это связано с наследственностью, возрастом, курением и экологией. Вторыми по значимости являются злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта. По данным официальной российской статистики, за период с 2014 по 2019 год «грубый» показатель заболеваемости вырос с 388,9 до 442,9.

По данным 153 регистров злокачественных новообразований в 62 странах, заболеваемость у мужчин выше, чем у женщин. Расчётные данные для человечества среди европейского населения в возрастной категории 0–85 лет свидетельствуют о том, что порядка 55 % злокачественных новообразований приходится на мужской пол, оставшиеся 45 – на женский [18; 143; 215; 217].

К сожалению, возросла и детская заболеваемость. Ежегодно у детей до восемнадцатилетнего возраста выявляют до 20 тыс. случаев рака, причём, если обратить внимание на возрастную категорию 1–5 лет, то на них приходится порядка 15 тыс. случаев. Так в детском возрасте наибольшая частота

онкологических заболеваний приходится на лимфобластный лейкоз и равна 29 %, следом расположились опухоли центральной нервной системы – 23 %, лимфомы – 12 % [9; 10; 104; 146].

Однако, на сегодняшний день уже доказана возможность излечения большинства злокачественных новообразований, посредством внедрения зарекомендовавших себя противоопухолевых схем лечения, включающих сочетание препаратов с различным токсическим эффектом и механизмом действия: стероидных гормонов, антиметаболитов, противоопухолевых антибиотиков, цитостатиков. Прорыв, совершенный в качестве диагностики и лечения злокачественных новообразований, привёл к возможности раннего назначения терапии, а также к уменьшению смертности населения от онкологических заболеваний [10; 20; 45; 53]. Так, например, в 2000 году смертность от злокачественных новообразований в России составила 13,4 % от общего количества больных онкологическими заболеваниями. В 2019 году смертность от онкологии значительно снизилась и составила 8,9 %, но всё так же продолжает занимать вторую строчку в статистике смертности населения в России. И всё же, несмотря на то, что применение противоопухолевых препаратов положительно сказывается на снижении смертности, они обладают высокой степенью агрессивности, ведь воздействие, препаратов данной категории, оказывается не только на опухолевые клетки, но и на здоровые ткани [33; 69]. Это связано с тем, что механизм действия противоопухолевых препаратов направлен на блокировку быстрого роста и деления опухолевых клеток [28; 233]. Кроме опухолевых клеток, также происходит повреждение клеток слизистых оболочек полости рта и желудочно-кишечного тракта, костного мозга, репродуктивной системы и волосяных фолликулов, кроме этого, возможно повреждение практически всех нормальных структур организма [15; 50; 52; 69; 225].

Увеличение продолжительности жизни больных гемобластозами и увеличение количества онкологических «долгожителей» вообще выдвинуло новую актуальную проблему – состояние здоровья и качество жизни в период ремиссии онкозаболевания или после излечения от него. Так цитостатически

индуцированное поражение яичек приводит к нарушению репродуктивной функции мужчин на «предтестикулярном» (ЦНС, ПНС, гипофиз), «тестикулярном» (гонады), «посттестикулярном» (эпидидимисы и др. органы мочеполовой системы, участвующие в сперматогенезе) уровнях репродуктивной системы, что особенно актуально на фоне резко снижающейся фертильности современной мужской популяции [13; 51; 66; 130]. Соответственно, понимание закономерностей процессов репаративной регенерации повреждённых тканей важно для разработки реабилитационных программ сохранения репродуктивной функции и качества жизни у пациентов после цитостатического лечения, особенно у лиц молодого возраста.

Таким образом, улучшение качества жизни людей, излечившихся от злокачественного новообразования, становится одной из главных проблем общественного здравоохранения. Токсичность, связанная с применением полихимиотерапии, способна вызывать поздние и долгосрочные побочные эффекты, бесплодие является одним из таких эффектов.

Органы репродуктивной системы человека являются малодоступным объектом для изучения прижизненно, поэтому эффекты цитостатических повреждений прослежены преимущественно на основе клинико-лабораторных данных, а сведений об этапах разворачивающихся морфофункциональных изменений явно недостаточно.

Имеются немногочисленные экспериментальные работы, в которых показано, что препараты группы СНОР оказывают неблагоприятное влияние на репродуктивную систему [6; 230].

Однако, в современных отечественных и зарубежных исследованиях отсутствуют данные, касающиеся оценки морфофункционального состояния половых желез при воздействии на организм химиотерапии под прикрытием антиоксиданта – дигидрокверцетина.

Степень разработанности темы диссертации

Несмотря на высокую клиническую значимость проблемы воздействия антибластной терапии на мужские половые железы, исследования, направленные на профилактику индуцированной полихимиотерапией азооспермии, остаются недостаточными. Морфологические исследования, посвящённые специфическим изменениям сперматогенеза и микроскопической анатомии семенников, подвергшихся противоопухолевой терапии, практически отсутствуют. Таким образом, существует значительный дефицит фундаментальных научных работ, направленных на выявление механизмов и степени поражения половой сферы мужчин при проведении интенсивной химиотерапии, что существенно ограничивает возможности разработки эффективных мер профилактики и коррекции негативных последствий лечения для репродуктивного здоровья пациентов.

Цель исследования

Изучить структурно-функциональное состояние семенников крыс после введения комплекса цитостатиков и при применении дигидрокверцетина.

Задачи исследования

1. Изучить макро- и микроскопические изменения в семенниках крыс после проведения курсов химиотерапии на различных этапах эксперимента.
2. Изучить морфометрические и иммуногистохимические параметры сперматогенного эпителия после проведения курсов химиотерапии на различных этапах эксперимента.
3. Оценить морфометрические изменения эндокринного аппарата семенников крыс после проведения курсов химиотерапии на различных этапах эксперимента.
4. Оценить уровень половых гормонов у экспериментальных животных, после проведения курсов химиотерапии на различных этапах эксперимента.

5. Провести цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс после проведения курсов химиотерапии на различных этапах эксперимента.

6. С помощью морфологических методов изучить антиоксидантные свойства дигидрокверцетина, включенного в курс химиотерапии, на различных этапах эксперимента.

Научная новизна

Впервые в эксперименте изучены морфофункциональные изменения семенников и эпидидимального содержимого у самцов крыс при двукратном введении комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР. Установлено, что химиотерапия вызывает стойкое повреждение сперматогенного эпителия, эндокринного аппарата семенников и нарушение гормональной регуляции, сопровождающееся ухудшением количественных и качественных показателей спермы.

Впервые на основании корреляционного анализа показано, что химиотерапевтическое воздействие комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР, приводит к прогрессирующему нарушению морфофункциональных взаимосвязей между эндокринным аппаратом семенников и сперматогенным эпителием.

Впервые показано протективное действие дигидрокверцетина, проявляющееся сохранением структуры семенников, улучшением сперматогенеза и нормализацией гормонального статуса при введении комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные сведения расширяют научные представления о патологических изменениях в семенниках при применении противоопухолевой терапии и ориентируют на возможность коррекции бесплодия природным биофлаваноидом — дигидрокверцетином.

Методология и методы исследования

Использовался системный подход и комплексный анализ полученных данных морфологических, биохимических, цитологических и иммуногистохимических исследований. Проводился комплексный анализ научных трудов отечественных и зарубежных авторов.

При исследовании семенников крыс проводилось определение массы и объема семенников. Стереологические параметры исследовались на 3 уровнях – гистотопографическом, тканевом и цитологическом. На цитологическом уровне в каждом наблюдении определялся «цитологический профиль сперматогенеза». Для иммуногистохимического исследования использовались 4 коммерческих моно- и поликлональных антител. Для биохимического исследования использовался иммуноферментный анализ половых гормонов (тестостерон, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны).

Положения, выносимые на защиту

1. Двукратное введение комплекса препаратов СНОР приводит к значительному повреждению процесса сперматогенеза, эндокринного аппарата семенников и сопровождается снижением синтеза тестостерона и компенсаторным увеличением выработки лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов.

2. Применение антиоксиданта дигидрохверцетина в сочетании с введением химиопрепаратов предотвращает развитие атрофии семенников, обеспечивает поддержание структурной целостности и функциональной активности эндокринного аппарата семенников.

Степень достоверности

Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным целям и задачам, позволяют получить доступные анализу достоверные результаты. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале с использованием

сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световой микроскопии, морфометрии, иммуногистохимического исследования), иммуноферментного исследования.

Апробации работы

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на: заседаниях проблемной комиссии Амурской государственной медицинской академии (Благовещенск, 2021, 2022, 2023, 2024); заседаниях Амурского областного научно-практического общества патологоанатомов (Благовещенск, 2021, 2022, 2023, 2024); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию НИИ Морфологии человека «имени академика А. П. Авцына» (Москва, 2021); V Дальневосточном медицинском молодежном форуме (Хабаровск, 2021); II Всероссийской научно-практической конференции «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы» (Самара, 2021); XIII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Нурсултан, Казахстан, 2022); VI Международной морфологической научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Новосибирск, 2021); VI Съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022); VII Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых (Новосибирск, 2022); 17-м Российско-Китайском форуме по биомедицинским и фармацевтическим наукам (Харбин, 2022); Научной конференции «Молодые ученые – науке» (Благовещенск, 2023); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологоанатомической практики» (Челябинск, 2023), VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологоанатомической практики» (Челябинск, 2024); Российско-Китайском биомедицинском форуме «Innovative methods of diagnostic and treatments in traditional Russian and Chinese medicine» (Харбин, 2024).

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты исследований используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. Методики и результаты исследований могут использоваться для улучшения понимания и выявления последствий химиотерапии на репродуктивные органы, обеспечивая лучшее обоснование лечебных стратегий и предупреждая возможные негативные последствия.

Публикации

Основное содержание диссертации отражено в 18 опубликованных научных работах, в том числе 5 статей в научных журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, из них 2 статьи в журнале категории К1, входящем в список изданий, распределённых по категориям К1, К2, К3.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список иллюстративного материала и список литературы из 239 источников, в том числе 173 работы зарубежных авторов. Работа включает 23 таблицы и 38 рисунков.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в выборе направления исследования, постановке цели и задач, в их реализации, в проведении экспериментального исследования и сборе экспериментального материала, применении методики подсчета структур

семенников крыс, иммуногистохимического анализа, статистической обработке полученных данных, выборе и описании иллюстративного материала.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сперматогенез и его регуляция

Яички выполняют две основные функции: экзокринную – через производство сперматозоидов в семенных канальцах; эндокринную – через секрецию тестостерона клетками Лейдига в интерстициальном компартменте. Таким образом, семенник делится на два взаимосвязанных компартмента [177].

Сперматогенез – это высокоспециализированный процесс, подчиняющийся пространственно-временным закономерностям, находящийся под строгим генетическим и гормональным контролем, включающий в себя процессы самообновления и коммитации стволовых сперматогониальных клеток, пролиферации, мейоза, апоптоза, дифференцировки, репарации и регенерации, происходящий в извитых семенных канальцах и представляющий из себя длительную серию стадий дифференцировки от стволовых клеток до образования зрелых половых клеток – сперматозоидов [89; 188].

Сперматогенез человека обусловлен тем, что недифференцированная сперматогония, полученная из сперматогониальных стволовых клеток, приводит к появлению диплоидных сперматоцитов, которые подвергаются мейозу I/II для получения гаплоидных сперматид [94; 116; 117; 157; 211; 194]. Сперматиды, в свою очередь, подвергаются сперматогенезу, образуя функциональные сперматозоиды [72; 172; 213]. После полового созревания в возрасте 12 лет здоровый человек способен производить более 200 миллионов сперматозоидов в день вплоть до 50 лет [73; 135, 166; 184], с постепенным снижением выработки сперматозоидов к 80 годам до 50 % [69; 75; 80; 123; 136; 154; 167]. Сперматогенез состоит из серии клеточных циклов, которые включают в себя самообновление сперматогониальных стволовых клеток и сперматогонии через митоз, трансформацию и дифференцировку сперматоцитов, генерацию гаплоидных сперматид с помощью мейоза и окончательное морфологическое созревание сперматид, которые, в конечном счете, становятся сперматозоидами. Таким

образом, сперматогенез находится под комплексным контролем регуляторных, гормональных и сигнальных систем. Наиболее важным из этих путей регулирования является гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная ось, включающая как фолликулостимулирующий гормон, так и лютеинизирующий гормон, а также тестостерон и эстрадиол-17 β в качестве ключевых регуляторов [118; 120; 141; 181; 201].

Структурно-функциональной единицей, вырабатывающей сперматозоиды посредством сперматогенеза, является семенной каналец, имеющий схожую структуру и состав сперматогенного эпителия как у взрослых людей, так и у грызунов. Сперматогенез поддерживается тестостероном, продуцируемым клетками Лейдига в интерстиции, и эстрадиолом-17 β , продуцируемым клетками Сертоли и зародышевыми клетками [97; 148; 170; 197]. У мужчин в каждом яичке имеется 400–600 семенных канальцев, длина всех трубочек, вместе взятых на пару яичек, составляет 400 метров, а диаметр каждого канальца составляет 200 мкм [208]. Сперматогенез происходит в поперечном сечении канальца, состоящего из клеток Сертоли и зародышевых клеток на разных стадиях развития. Эти половые клетки включают недифференцированные сперматогонии, темные сперматогонии типа А, бледные сперматогонии типа А, сперматогонии типа Б, прелептотеновые, лептотеновые, зиготеновые и пахитеновые первичные сперматоциты и вторичные сперматоциты, а также сперматиды Sa, Sb, Sc, Sd1 и Sd2, пока Sd2 не трансформируется в сперматозоиды [206]. Клетки Сертоли и зародышевые клетки вблизи основания сперматогенного эпителия находятся в тесном контакте с базальной мембраной, которая представляет собой модифицированную форму внеклеточного матрикса и состоит в основном из коллагена IV типа и ламининов, гепаринсульфатного протеогликана и нидогена/энтактина [91; 112]. За базовой мембраной находится слой коллагена 1-го типа, за которым следует слой миоидных клеток, лимфа, а затем лимфатический эндотелий. В совокупности они образуют собственную оболочку [92; 170]. Во время сперматогенеза половые клетки, в частности постмейотические сперматиды, полагаются почти исключительно на клетки

Сертоли для структурной, питательной и паракринной поддержки, поскольку гаплоидные сперматиды являются метаболически покоящимися клетками с относительно небольшим количеством цитозоля для поддержания их клеточных функций [178; 228]. Таким образом, клетки Сертоли известны как «материнские» клетки, причем каждая клетка Сертоли поддерживает 30–50 развивающихся зародышевых клеток, как показывает морфометрический анализ семенников крысы [16; 42; 47; 46; 83]. У человека клетки Сертоли подвергаются митотическому размножению в две отдельные фазы. Первая фаза наступает вскоре после рождения, в неонатальном периоде, когда популяция клеток Сертоли увеличивается за счет митотической пролиферации [8; 24]. В период полового созревания клетки Сертоли снова быстро делятся митотически [106; 119; 126], давая начало 500×10^6 клеткам Сертоли на яичко (каждое яичко взрослого человека весит 18–19 г). Количество клеток Сертоли снижается до 300×10^6 к 50–85 годам, что приводит к снижению суточной выработки сперматозоидов [180]. У крыс в семеннике примерно $30\text{--}40 \times 10^6$ клеток Сертоли [106; 119; 126; 153; 179]. Количество клеток Сертоли определяется ФСГ, гормонами щитовидной железы, гормоном роста и несколькими паракринными факторами роста [40; 144]. В интерстициальном пространстве расположены клетки Лейдига, фибробласты, а также макрофаги и микрососуды. Интересно, что уровень тестостерона в интерстициальной жидкости и жидкости семенных канальцев в 50–70 раз выше, чем уровень тестостерона в системном кровообращении крыс [41; 218; 185]. У людей уровень тестостерона в интерстициальной жидкости также в 100 раз выше, чем в системном кровотоке [85; 91; 226], что свидетельствует о том, что в семеннике поддерживается значительно более высокий уровень тестостерона для поддержки сперматогенеза.

Сперматогенный эпителий млекопитающих состоит из двух функциональных слоев, разделенных гематотестикулярным барьером: базального и апикального слоев. Гематотестикулярный барьер – это барьер между кровеносными капиллярами и сперматогенным эпителием, образованный, в большей степени, плотными контактами между клетками Сертоли. основной его

функцией является ограничение контакта клеток иммунной системы с антигенами сперматозоидов. Таким образом, недифференцированные сперматогонии типа А и Б, а также прелептотеновые сперматоциты, дифференцированные от сперматогоний типа Б, находятся в базальном отделе. Дифференцированные первичные, вторичные сперматоциты, гаплоидные сперматиды, включая сперматозоиды, находятся в апикальном отделе.

Гематотестикулярный барьер создает уникальную микросреду, благотворно влияющую на фазы мейоза и постмейотическое развитие сперматид, таким образом, формируя иммунологический барьер. Ряд исследований показали вклад гематотестикулярного барьера в формировании иммунной толерантности семенников, поскольку зародышевые клетки иммуногенны и содержат ряд специфических антигенов. В том числе иммунная толерантность семенников поддерживается клетками Сертоли за счет их секреторных биомолекул, обладающих иммуносупрессивным действием: цитокины, биоактивные липиды, пептиды, а также андрогены, выделяемые клетками Лейдига. Гематотестикулярный барьер формируется в период полового созревания, а именно к 12–13 годам, в тот момент, когда клетки Сертоли перестают делиться и становятся полностью дифференцированными, что сопровождается началом мейоза.

Развитие зародышевых клеток, в частности сперматид, зависит от структурной, питательной и паракринной поддержки клеток Сертоли. Данная зависимость опосредована клеточными соединениями, на границе клетка Сертоли – зародышевая клетка, включающая большое количество генов и их белков [182; 202; 106; 119; 126]. Несмотря на то, что недифференцированные сперматогонии, сперматогонии типа А, Б и прелептотеновые сперматоциты находятся вне гематотестикулярного барьера, они также полагаются на клетки Сертоли для функциональной и структурной поддержки посредством экспрессии уникальных генов.

Гормональная регуляторная ось оказывает регулирующее действие на семенники посредством высвобождения гонадотропин-рилизинг гормона

гипоталамусом, который в свою очередь, регулирует секрецию лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормона гипофизом. Тестостерон, вырабатываемый интерстициальными клетками Лейдига, обеспечивает обратную связь для выработки гонадотропин-рилизинг гормона гипоталамусом [12; 25; 37; 81; 93; 132]. Ингибин, вырабатываемый клетками Сертоли, обеспечивает избирательную обратную связь с выработкой фолликулостимулирующего гормона. Клетки Сертоли модулируют сперматогенез посредством перекрестного взаимодействия с клетками Лейдига, стимулируя дифференцировку клеток Лейдига и ингибируя стероидогенез [67; 176; 216]. Ряд исследований показали, что клетки Сертоли поддерживают количество и развитие клеток Лейдига (как эмбриональных, так и взрослых) [149; 190], а также определяют статус дифференцировки клеток Лейдига через ген *Wt1* [236]. С другой стороны, клетки Сертоли также взаимодействуют с зародышевыми клетками для поддержки сперматогенеза с помощью ряда паракринных факторов [128; 190; 207].

Стоит отметить, что существует функциональное перекрестное взаимодействие между клетками Сертоли и собственной оболочкой, в частности, перитубулярными миоидными клетками в производстве и отложении компонентов внеклеточного матрикса [205] для производства и поддержания базальной мембраны. Исследования показали, что перитубулярные миоидные клетки модулируют функцию клеток Сертоли, они продуцируют P-Mod-S. [207]. Тем не менее, роль данного фактора еще не до конца изучена.

Сперматогонии являются клетками-предшественниками всех зародышевых клеток и обозначаются как клетки типа А и типа Б [78; 97; 116; 117]. У людей сперматогонии типа А дополнительно делятся на клетки-предшественники – темные и светлые сперматогонии типа А, которые в свою очередь подвергаются митотической пролиферации для самообновления [150]. Светлые сперматогонии тип А являются преобладающими сперматогониями, способными выживать после радио- и химиотерапии в то время, как темные сперматогонии тип Б в значительной степени подвергаются элиминации во время радио- и

химиотерапии, иллюстрируя, что светлые сперматогонии тип А являются сперматогониальными стволовыми клетками [212]. В настоящее время принято считать, что темные сперматогонии тип А являются пулом резервных сперматогоний, находящихся в состоянии покоя, однако при необходимости они могут дать начало светлым сперматогониям типа А и считаются «истинными» сперматогониальными стволовыми клетками у людей [74; 132].

Несмотря на то, что развитие зародышевых клеток посредством сперматогенеза в семенниках человека и крыс схоже, существует и ряд различий. Например, в процессе самообновления и дифференцировки сперматогониев.

Сперматоциты, а именно лептотеновые, зиготеновые, пахитеновые и диплотеновые, обнаруживаются в сперматогенном эпителии человека после инициации мейоза в период полового созревания [88; 90; 156]. Диплотенные сперматоциты подвергаются мейозу I с образованием вторичных сперматоцитов (с гаплоидным набором хромосом, но содержанием ДНК $2n$), которые быстро прогрессируют до мейоза II, так что один вторичный сперматоцит продуцирует две гаплоидные круглые сперматиды Sa. В этом контексте интересно отметить, что, в отличие от других соматических клеток, ни сперматоциты, ни сперматиды не метаболизируют глюкозу; вместо этого они используют лактат, поставляемый клетками Сертоли в качестве источника энергии [112; 173]. Глюкоза поглощается клетками Сертоли через GLUT1 и перерабатывается в лактатглицолизически специфичной для яичек LDHC4 [71; 127; 210]. Лактат выводится из клеток Сертоли транспортером MCT1 и поглощается мейотическими и постмейотическими зародышевыми клетками через их MCT2 [86]. Исследования показали, что энергетический метаболизм клеток Сертоли и зародышевых клеток регулируется ФСГ, стероидами, инсулином и паракринными факторами, и их нарушение приводит к мужскому бесплодию [158; 185]. Также отмечено, что дефекты мейоза, такие как остановка мейотического созревания (или остановка раннего созревания), обнаруживаются у ~ 10 % мужчин с необструктивной азооспермией, с гистопатологическими признаками уменьшения диаметра

канальцев, уменьшения количества зародышевых клеток и дегенерации сперматоцитов [96; 214].

Процесс, в ходе которого сперматиды подвергаются обширной морфологической трансформации через круглые сперматиды Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1 и Sd2, и, в конечном счете, превращаются в сперматозоиды, известен как спермиогенез [16; 70]. Во время этого процесса дальнейших клеточных делений не происходит, новообразованные круглые сперматиды из вторичных сперматоцитов характеризуются небольшим сферическим ядром с обычным набором цитоплазматических органелл, включая аппарат Гольджи, митохондрии и центриоли [107]. Каждая сперматида претерпевает значительные морфологические изменения, которые начинаются с крупной гранулы, называемой акросомной гранулой, которая образуется несколькими маленькими проакросомными гранулами в области аппарата Гольджи, который растет над ядром. По мере продолжения спермиогенеза акросома трансформируется дальше, и начинается конденсация ядерного хроматина [99]. На заключительных этапах ядро сперматиды завершает конденсацию хроматина, и большая часть цитоплазмы в итоге отделяется от сперматиды с образованием остаточного тела, которое поглощается клеткой Сертоли и перерабатывается в фагосому. Затем фагосома транспортируется к основанию клетки Сертоли для лизосомальной деградации [122]. У людей спермиогенез может быть нарушен, что приводит к: задержке позднего созревания, проявляющейся остановкой развития ранних сперматид с темными круглыми ядрами, и гипосперматогенезу с остановкой дальнейшего развития конденсированных овальных сперматид [108]. Зрелые сперматозоиды, однажды сформировавшись, высвобождаются в просвет канальца через конечный клеточный процесс сперматогенеза при спермификации [174; 195]. Хотя молекулярный механизм, лежащий в основе спермиообразования остается относительно неисследованным, исследования на грызунах показали, что спермиообразование жестко регулируется пространственно-временной экспрессией сигнальных молекул, таких как p-FAK-Tyr⁴⁰⁷, а также актинсвязывающих/регуляторных белков (например, комплекса Arp2/3, Eps8),

включая дегенерацию апикальных участков эктоплазматической специализации и образование фрагментов ламинина [137; 195]. Однако этот процесс у людей плохо изучен за исключением того, что он, вероятно, зависит от ФСГ и тестостерона. До сих пор мужское бесплодие человека не объяснялось только дефектами спермиевыделения [11; 44; 174].

В семенниках человека, а также грызунов отличительные клеточные ассоциации в сперматогенного эпителии вдоль канальцев можно разделить на различные стадии, которые циклически проявляются на протяжении всего сперматогенеза, известного как эпителиальный цикл сперматогенеза [78; 105; 108]. В семенниках крыс, мышей и человека эпителиальный цикл состоит из I–XIV, I–XII и I–VI стадий соответственно [71; 78; 239]. Спермификация и мейоз I/II происходят на стадиях VIII и XIV, VIII и XII и II и VI в семенниках крысы, мыши и человека соответственно. Для завершения эпителиального цикла у человека требуется около 16 дней [213] по сравнению с 8,6 днями у мыши [103] и 12,8 днями у крысы [108]. Однако продолжительность сперматогенеза, то есть перехода от сперматогоний типа А к сперматозоидам, составляет ~ 68 дней (4,2 цикла) у людей по сравнению с ~ 35 днями (4 цикла) и ~ 58 днями (4,5 цикла) у мышей и крыс [95; 102; 145]. Это время необходимое для того, чтобы один диплоидный Ар-сперматогоний человека (зародышевая клетка-предшественник, где Ad-сперматогоний является регенеративной резервной стволовой клеткой) развился во множество гаплоидных сперматозоидов, что требует ~ 4,2 циклов. В этом контексте отмечается, что стадия эпителиального цикла в значительной степени определяется изменениями в области комплекса Гольджи развивающихся сперматид, а именно в акросоме, когда это визуализируется периодической кислотной реакцией Шиффа. Классификация сперматид человека на 6 стадий: Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1 и Sd2 была основана на использовании дихромата осмия в качестве фиксатора человеческого семенника, который затем окрашивали осмием и исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии [224].

Гормональная регуляция сперматогенеза у людей представляет собой сложное биологическое явление, включающее как тестостерон, так и эстрадиол-17 β

[129, 131; 176, 192; 232] и жестко регулируется гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системой с помощью ФСГ и ЛГ, которые оказывают свое воздействие на клетки Сертоли и Лейдига соответственно. Помимо этих гормонов, также задействованы ингибины, активины, фоллистатин и другие паракринные факторы.

ФСГ является важным регулятором сперматогенеза благодаря воздействию на клетки Сертоли, где экспрессируются рецепторы ФСГ. ФСГ активирует по меньшей мере пять сигнальных путей в клетках Сертоли: цАМФ-РКА, MAPK, PI3K-AKT, внутриклеточный Ca и фосфолипазу A2 [93; 155; 214]. Профили экспрессии генов указывают на то, что ФСГ регулирует набор генов клеток Сертоли. ФСГ способствует пролиферации клеток Сертоли до наступления половой зрелости, в то время как после наступления половой зрелости ФСГ активирует клетки Сертоли для поддержки развития зародышевых клеток. Несмотря на важную роль ФСГ в сперматогенезе, этот гормон, в отличие от тестостерона, не считается необходимым для сперматогенеза, а скорее регулирует его. Например, удаление субъединицы ФСГ- β у мышей привело к бесплодию у самок с дефицитом ФСГ из-за блокады фолликулогенеза, но самцы с дефицитом ФСГ были фертильны, даже несмотря на то, что семенники этих мышей были уменьшены в размере [158; 189]. Кроме того, у мужчин с инактивирующими мутациями гена ФСГ- β или рецептора ФСГ нарушен сперматогенез, но в целом они остаются фертильными – наблюдение, частично объясняемое тем, что рецептор FSH обладает низким уровнем конститутивной активности в отсутствие ФСГ [103; 185; 234]. С другой стороны, у мужчин с врожденным полным гипогонадотропным гипогонадизмом обычно лечат ХГЧ вместе с ФСГ для стимуляции развития яичек, сперматогенеза и фертильности. Кроме того, у мужчин с идиопатической олигоастенотератозооспермией, получавших рекомбинантный ФСГ в течение 3 месяцев, было обнаружено значительное улучшение параметров семенной жидкости по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения [193; 204].

Основная функция ЛГ заключается в стимуляции выработки тестостерона клетками Лейдига [134; 160, 185]. Экспрессия LHCG-рецептора начинается в клетках Лейдига плода [67]. У мужчин с инактивирующими мутациями LHCG развиваются неоднозначные гениталии и наблюдается дефицит тестостерона, что указывает на то, что передача сигналов ХГЧ/ЛГ необходима для выработки тестостерона у плода и взрослого [77; 161; 162; 236]. ЛГ стимулирует выработку тестостерона, стимулируя экспрессию ключевых генов стероидогенных ферментов, а также факторов транскрипции, которые необходимы для биосинтеза тестостерона для поддержки сперматогенеза [27; 218]. Связывание лиганда с LHCG стимулирует аденилатциклазу, увеличивает выработку цАМФ и фосфорилирует белки-мишени через протеинкиназы A и C, активирует ERK 1 и 2 и усиливает кальциевую сигнализацию [106; 119; 126].

1.2 Бесплодие, обусловленное применением курсовой химиотерапии

На сегодняшний день доказана возможность излечения большинства злокачественных новообразований посредством внедрения зарекомендовавших себя противоопухолевых схем лечения, включающих сочетание препаратов, с различным токсическим эффектом и механизмом действия: стероидные гормоны, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, цитостатики. Прорыв, совершенный в качестве диагностики и лечения злокачественных новообразований, привёл к началу терапии на ранних сроках, а также к уменьшению смертности населения от онкологических процессов [18; 143; 203]. Несмотря на снижение смертности населения, современные противоопухолевые препараты отличаются высокой степенью агрессивности, ведь воздействие, препаратов данной категории, оказывается не только на участки малигнизации, но и на здоровые ткани [139]. Это связано с тем, что механизм действия противоопухолевых препаратов направлен на блокировку быстрого роста и деления опухолевых клеток. Кроме опухолевых клеток, также происходит повреждение клеток слизистых оболочек полости рта и желудочно-кишечного

тракта [52], костного мозга [15], репродуктивной системы [6] и волосяных фолликулов [50; 221], кроме этого, возможно повреждение практически всех нормальных структур организма [28; 32; 33; 109].

Таким образом, улучшение качества жизни людей, излечившихся от злокачественного новообразования, становится одной из главных проблем общественного здравоохранения [45; 53]. Токсичность, связанная с применением полихимиотерапии, способна вызывать поздние и долгосрочные побочные эффекты, одним из таких эффектов является бесплодие.

Детский возраст часто рассматривают как наиболее спокойный период развития яичек, способствующий защите гонад от неблагоприятного воздействия химиотерапии [74]. Таким образом, имеется мало данных о влиянии химиотерапии в детском возрасте на функции гонад, большинство из них выведено из исследований взрослых. Однако в гонадах в препубертатный период постепенно активируются функции, связано это с увеличением объёма яичек, пролиферацией незрелых клеток Сертоли и увеличением клеток Лейдига. Успешное установление этих физиологических изменений влияет на развитие гонад в пубертатный период, а, следовательно, и на возможность продолжения рода взрослого. Следует отметить, что большинство исследований в данном обзоре, определяют влияние химиотерапии как на мальчиков в препубертатном периоде, так и на подростков, достигших постпубертатного периода [68; 79; 221].

Бесплодие, наблюдаемое на фоне гонадотоксического действия полихимиотерапии, применяемой для лечения злокачественных новообразований, может быть результатом прямого повреждения половых клеток или косвенного повреждения эндокринного и паракринного контроля соматических клеток [237]. В младенчестве клетки Сертоли активно пролиферируют, что делает их потенциальной мишенью токсического воздействия алкилирующих препаратов, входящих в схему лечения злокачественных новообразований у детей [140; 183]. Мало данных о долгосрочном воздействии химиотерапии в детском возрасте на клетки Сертоли [197]. Maumon В. в 2004 году своим исследованием продемонстрировал наличие незрелых клеток Сертоли (экспрессивный

цитокератин-18 обычно отсутствует после полового созревания) у мужчин с азооспермией, прошедших химиотерапию в возрасте 13 лет [196]. Кроме того, Brämwig J. H. в 1990 г. и Van Casteren N. J. в 2009 г. отметили, что снижение количества сперматозоидов, которое можно обнаружить у мужчин, перенёсших онкологию в детском возрасте, было системно связано с повышением уровня фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), косвенно отражающего изменения клеток Сертоли [113; 221]. Исследования *in vitro* с использованием семенников крыс в препубертатном периоде не показали токсического влияния доксорубина, цисплатина или циклофосфида на количество клеток Сертоли после 48-часового воздействия доксорубина, цисплатина или циклофосфида.

Aslani F. с коллегами в своем исследовании выявили устойчивость к гибели клеток Сертоли, выделенных из семенников крыс, находящихся в препубертатном периоде, после 24-часового воздействия цисплатина и этопозиды *in vitro* [187]. Выживаемость клеток Сертоли можно объяснить механизмом ингибирования апоптоза и аутофагии. Однако повышенный окислительный стресс был измерен в незрелой клеточной линии Сертоли после воздействия доксорубина [82; 159]. Введение ингибитора ДНК – топоизомеразы II – приводило к морфологическим и ядерным изменениям: вакуолизация цитоплазмы и аномальная конденсация хроматина [137]. Дисфункция клеток Сертоли наблюдалась после воздействия химиотерапевтических препаратов *in vivo* со сниженной продукцией андрогенсвязывающего белка и трансферрина – двух белков, участвующих в регуляции сперматогенеза [159; 175]. Несмотря на их важную роль в поддержании сперматогенеза и ниши ССК, мало внимания уделялось миоидным клеткам и клеткам Лейдига, также ни одно исследование не включало исследования макрофагов. Насколько известно, только в одном экспериментальном исследовании, в 2009 году Nurmio M. с коллегами изучили перитубулярные миоидные клетки и было продемонстрировано, что воздействие доксорубина *in vitro* не повлияло на пролиферацию миоидных клеток в тестикулярной ткани крыс [125; 164].

Ряд исследований, проведённых в 1990, 1996 и 2001 годах показывают, что функция клеток Лейдига у людей, перенёвших злокачественное новообразование в детском возрасте, нарушена [152; 221; 223]. У ряда пациентов наблюдалось небольшое снижение уровня тестостерона в плазме крови и значительное повышение уровня лютеинизирующего гормона в плазме крови вследствие усиленного ответа ЛГ на гонадотропин-релизинг-гормон для компенсации дисфункции клеток Лейдига [169; 121]. Isaksson S. в своих исследованиях сообщает о негативном влиянии химиотерапии на эндокринную функцию гонад [138].

Успешное завершение фаз сперматогенеза зависит от нормального эндокринного баланса. У мужчин с онкологическим анамнезом оценка функции яичек достигается путем измерения уровня гормонов ФСГ, ЛГ и тестостерона в образце крови [81; 124; 128; 129]. Эти биомаркеры были измерены для оценки повреждения яичек в результате лечения рака, особенно в тех случаях, когда анализ спермы был невозможен. В клинической практике измерение сывороточного тестостерона и ЛГ было использовано для оценки нарушения функции клеток Лейдига. Оценить функцию клеток Сертоли сложнее из-за отсутствия надежных измеримых биомаркеров. В большинстве случаев дисфункция клеток Сертоли сочетается с повышением уровня ФСГ, связанного со сперматогенной недостаточностью. Некоторые исследования предполагают, что для оценки используется соотношение ингибин/ФСГ, поскольку клетки Сертоли являются основным источником ингибина в яичке, и он может быть циркулирующим маркером функции клеток Сертоли. После химиотерапии у взрослых мужчин с гематологическими злокачественными новообразованиями наблюдается снижение ингибина В, связанное с повышением уровня ФСГ, что свидетельствует о повреждении клеток Сертоли и потере контроля ФСГ с отрицательной обратной связью [115; 159]. Однако, трудно оценить повреждение клеток Сертоли, используя только индекс ингибин/ФСГ, из-за тесного взаимодействия между гонадотропной осью и клетками Сертоли и Лейдига. Поэтому было бы лучше оценить паттерн сывороточного ингибина/ФСГ в сочетании с другими гормональными факторами, такими как тестостерон и ЛГ.

Введение циклофосфида взрослым мышам приводит к нарушению экспрессии белка в клетках Сертоли. Этот алкилирующий агент вызывает снижение продукции нейротрофического фактора глиальных клеток, участвующего в самообновлении сперматогониальных стволовых клеток и дифференцировке сперматогоний. Кроме того, снижается экспрессия окклюдина, основного компонента плотных соединений, необходимого для функционирования гематоэнцефалического барьера, в то время как повышается экспрессия трансформирующего фактора роста $\beta 3$, нисходящего регулятора плотных соединений. Нарушение экспрессии белка в клетках Сертоли в результате воздействия химиотерапии может нарушить сперматогенез [91; 147; 217; 230]. Клетки Лейдига, секретирующие тестостерон, часто считались более устойчивыми к химиотерапии, чем зародышевые клетки и клетки Сертоли. Однако было показано, что функция клеток Лейдига может быть нарушена у больных, перенёвших курсовую полихимиотерапию, связано это с повышением уровня ЛГ в крови и низкой или нормальной концентрацией тестостерона. В 1983 году Setchell B. была выдвинута гипотеза, что изменение сперматогенного эпителия может привести к уменьшению объема яичек и кровотока и, следовательно, ограничению уровня тестостерона, покидающего яичко [200]. Это снижение кровотока может быть компенсировано клетками Лейдига путем увеличения внутриклеточной концентрации тестостерона. Снижение артериального кровотока приводит к нарушению паракринного контроля клеток Лейдига и снижению стимулирующего ответа на лютеинизирующий гормон. В яичках взрослых крыс было обнаружено, что химиотерапия блеомицином, этопозидом и цисплатином индуцирует состояние окислительного стресса, гиперплазию клеток Лейдига и ингибирование транскрипции генов, кодирующих стероидогенные ферменты.

Снижение экспрессии гена CYP19A1, связанное с увеличением популяции клеток Лейдига, может объяснить низкий/нормальный уровень тестостерона. Как и в препубертатном яичке, данные о влиянии химиотерапии на соматические клетки в основном ограничены клетками Сертоли и Лейдига. Ни в одном

исследовании не изучалось влияние противоопухолевой терапии на макрофаги, несмотря на их роль «хранителей фертильности» [169; 190; 199].

Лечение рака у детей обычно содержит алкилирующие агенты. Использование эквивалентной дозы циклофосфида рекомендуется для количественной оценки воздействия алкилирующих агентов, и была зарегистрирована отрицательная корреляция между эквивалентной дозой и концентрацией сперматозоидов в когорте взрослых мужчин, перенёсших рак в детском возрасте [87; 113]. Исследование, основанное на большой когорте из 214 пациентов, лечившихся от рака в период с 1970 по 2002 год, сообщает, что у 25 % взрослых, получавших алкилирующие агенты в детстве, возникает азооспермия. У нормозооспермических пациентов (48 %) наблюдается нарушение подвижности и морфологии сперматозоидов. Другое исследование, включавшее пациентов, получавших лечение в тот же период, что и предыдущие (1970–2002), показало, что процент пациентов с азооспермией достигал 50 % у мужчин с диагнозом лимфомы Ходжкина. У 67 % пациентов, получавших стерилизующую дозу алкилирующих агентов, наблюдается азооспермия [104; 171].

Нарушение фертильности зависит не только от типа рака и стадии заболевания, но в основном от схемы терапии.

Токсическое влияние химиотерапии на сперматогонии и сперматоциты трудно исследовать как у мужчин, так и у самцов крыс без биопсии яичек, отсюда имеется мало данных о биомаркёрах повреждения сперматогоний и сперматоцитов. АМГ был предложен в качестве маркера индуцированного химиотерапией токсического действия на яички в сочетании с ФСГ, тестостероном и ингибином В.

Так, повышение уровня АМГ в сыворотке крови наблюдалось у пациентов (средний возраст составил 38 лет) через шесть месяцев после лечения алкилирующими агентами, в то время как этот гормон в целом снижался с началом созревания яичек. Уменьшение количества сперматоцитов и сперматозоидов, вызванное химиотерапией, снижает выработку ингибина В. Отрицательная обратная связь контроля ФСГ нарушается и, следовательно,

вызывает повышение уровня АМГ. Исследования на более крупных когортах необходимы для определения роли АМГ и его использования в качестве биомаркера токсического действия на яички, как это было предложено для оценки токсического действия химиотерапии. У перенесших химиотерапию в ходе лечения рака, происходит снижение качества спермы (снижение количества и подвижности сперматозоидов, увеличение аномальных форм), которое может сохраняться в течение нескольких лет после завершения лечения рака, что позволяет предположить, что противоопухолевые препараты оказывают долгосрочное токсическое действие на ССК [111; 183; 230]. Повреждения ССК могут сохраняться на протяжении всего цикла сперматогенеза. Из-за их редкости и сложности очистки очень немногие исследовали повреждения ССК после действия химиотерапии. Лечение рака приводит к снижению количества и пролиферативной активности ССК крыс. В сперматогониальной клеточной линии крыс после воздействия доксорубина была обнаружена повышенная экспрессия CDKN1a – белка, участвующего в остановке клеточного цикла, и экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК [163; 231]. Цитотоксические эффекты химиотерапевтических соединений были также оценены при недифференцированном сперматогенезе у крыс [100; 133]. Таким образом, недифференцированные сперматогонии А-выровненные сильно истощаются после введения *in vivo* ВЕР по сравнению с недифференцированными А-изолированными и А-спаренными. Сперматоциты также чувствительны к цитогенотоксическому действию химиотерапевтических соединений. Воздействие раковых препаратов в зрелом возрасте приводит к увеличению числа семенных канальцев, лишенных половых клеток, что связано с уменьшением диаметра семенных канальцев, а вакуолизация эпителия влечет за собой снижение массы яичек у грызунов [235]. Многочисленные химиотерапевтические соединения индуцируют повышенный окислительный стресс в тканях яичек, связанный с понижением регуляции антиоксидантных ферментов, необходимых для предотвращения избыточного образования активных форм кислорода. Этот рост окислительного стресса может привести к повреждению ДНК в зародышевых клетках, а накопление

повреждений ДНК приводит к гибели зародышевых клеток. Циклофосфамид индуцирует апоптоз в сперматогониях и сперматоцитах. Вследствие апоптоза половых клеток может развиваться олигозооспермия или азооспермия, однако апоптоз также предотвращает образование сперматозоидов с повреждениями ДНК и их потенциальную передачу потомству.

На животных, получавших химиотерапию, было показано, что поврежденные половые клетки могут выйти из апоптоза и привести к аномальной выработке сперматозоидов. Была выдвинута гипотеза, что повышенная экспрессия протоонкогена и нарушение контрольных точек клеточного цикла могут объяснить выживаемость аномальных половых клеток после введения схемы ВЕР. Помимо изменения экспрессии генов, некоторые химиотерапевтические агенты также способны вмешиваться в процесс репликации ДНК или сегрегации хромосом. Это относится к этопозиду, ингибитору топоизомеразы II, который предотвращает образование двойных нитей ДНК после репликации, приводя к фрагментации хромосом, и ингибирует нормальную сегрегацию гомологичных хромосом, приводя к анеуплоидии в постмейотических клетках мыши.

Небольшое количество исследований посвящены ядерным аномалиям сперматозоидов. Согласно трём исследованиям, посвящённым изучению целостности ДНК сперматозоидов у детей, перенесших рак, можно сделать вывод, что у взрослых, переживших рак в детском возрасте, ДНК сперматозоидов и целостность хроматина, по-видимому, не затрагиваются химиотерапией [163; 238]. Однако воздействие химиотерапии в подростковом возрасте способствует эпимутациям и изменяет метилирование ДНК в сперматозоидах. Повреждения ДНК были выделены на экспериментальных моделях. Аномалии головки почти у 50 % сперматозоидов, связанные с нарушением уплотнения хроматина, наблюдались у взрослых мышей, получавших лечение циклофосфамидом в возрасте 14 дней [220], разрывы цепей ДНК также обнаруживаются в сперматозоидах после лечения доксорубицином у 30-дневных крыс. Данные о

качестве ядерных сперматозоидов после воздействия химиотерапии в детстве остаются ограниченными как у людей, так и у животных моделей.

В то время как сперматогенез может восстановиться после завершения химиотерапии, стойкие ядерные повреждения обнаруживаются в сперматозоидах большинства выживших после рака. Действительно, значительный уровень повреждений ДНК и хроматина сперматозоидов наблюдался в образцах спермы онкологических больных даже после 24-месячного периода восстановления. Ядерные аномалии, наблюдаемые в эякулированных сперматозоидах, по-видимому, варьируют в зависимости от стадии дифференцировки (сперматогонии, сперматоцитов или сперматид) во время воздействия химиотерапии и используемого противоопухолевого агента. Лечение рака вызывало абберрантную сегрегацию хромосом, что поспособствовало образованию сперматозоидов с численными хромосомными аномалиями. У пациентов, получавших лечение от рака яичек по схеме BEP, общая частота анеуплоидии сперматозоидов, оцененная с помощью FISH для хромосом 8, 12, 18, X и Y, значительно увеличилась через шесть месяцев после лечения. Аналогично другое исследование, включавшее пять пациентов, получавших BEP, показало увеличение частоты дисомии и диплоидии для хромосом 16 и 18 в течение периода восстановления от 6 до 18 месяцев [163; 165]. Повышенная частота нуклисомии хромосом 13 и 21 наблюдалась у больных раком яичек и лимфомой Ходжкина через 18–24 месяца после начала химиотерапии. Большинство исследований с использованием FISH-анализа сообщают о дисомии половой хромосомы у пациентов после режима CHOP/MOPP-ABV, ABVD или BEP. У 40 % больных раком яичек не произошло восстановления до нормальных показателей анеуплоидии сперматозоидов после лечения, и было бы целесообразно отложить зачатие до 24 месяцев, после более чем двух циклов химиотерапии BEP, чтобы предотвратить потенциальный риск анеуплоидного зачатия. Химиотерапевтическое лечение оказывает пагубное воздействие на хромосомную конституцию сперматозоидов в зависимости от получаемой терапии и задержки после окончания лечения. Многоцентровое проспективное

исследование оценки анеуплоидии сперматозоидов у больных лимфомой показало, что лечение ABVD и CHOP/MOPP-ABV приводило к увеличению частоты анеуплоидии через три месяца после завершения лечения. У пациентов, получавших ABVD, показатели анеуплоидии возвращались к более низким значениям, чем до лечения, через один или два года после химиотерапии, тогда как эти показатели оставались относительно высокими до двух лет после лечения у пациентов, получавших CHOP/MOPP-ABV [70; 110; 227].

Эпидемиологические данные по анеуплоидии сперматозоидов совпадают с экспериментальными результатами, полученными на моделях грызунов. Лечение этопозидом у мышей приводило к увеличению частоты анеуплоидии сперматозоидов через 49 дней после окончания химиотерапии. Воздействие этопозидов на пахитеновые сперматоциты приводило к увеличению частоты хромосомных численных и структурных аномалий (дупликаций и делеций) в сперматозоидах мышей, тогда как воздействие на ССК приводило только к структурным аномалиям хромосом сперматозоидов. После противоопухолевой терапии некоторые исследования не показывают изменения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов у пациентов, получавших лечение по поводу опухолей зародышевых клеток яичек, а также лимфомы Ходжкина и Неходжкинских. Однако повышение оценки фрагментации ДНК сперматозоидов с помощью анализа COMET и TUNEL наблюдается у пациентов с раком яичек и лимфомой Ходжкина после периода восстановления более 24 месяцев. Фрагментация ДНК может быть ответственна за аномальное уплотнение хроматина, обнаруженное при анализе структуры хроматина сперматозоидов у больных раком яичек [209]. Ряд противоопухолевых препаратов, такие как алкилирующие препараты, модифицировали основание ДНК и индуцировали перекрестные связи ДНК, которые были выделены во многих тканях у людей со злокачественными новообразованиями. В яичках крыс аддукты ДНК наблюдались после воздействия цисплатина и могли бы объяснить разрывы цепей ДНК в сперматозоидах. Более высокая доля сперматозоидов с одноцепочечными разрывами ДНК и перекрестными связями была зарегистрирована у взрослых

крыс, подвергшихся длительному лечению алкилирующими препаратами. Наличие повреждений ДНК сперматозоидов коррелирует с аномальным уплотнением хроматина. Введение ВЕР крысам индуцировало дефектное уплотнение хроматина сперматозоидов при наличии низких уровней протамина 1 и высоких уровней гистонов в ядрах сперматозоидов. Лечение ВЕР нарушает гиперацетилирование гистона 4, которое было необходимо для рекрутирования BRDT, необходимого для удаления гистонов и связывания переходных белков и протаминов. Более высокая доля H3K9me, и сниженная доля тестоспецифического гистона 2B, наблюдаемая после лечения ВЕР, могут предотвратить деконденсацию хроматина в пахитеновых сперматоцитах. Высокая степень упаковки хроматина улучшает подвижность сперматозоидов и играет ключевую роль в защите ДНК, поскольку зрелые сперматозоиды лишены механизмов репарации. Профили метилирования ДНК были нарушены у 46 % пациентов с олигозооспермией. Гипометилирование гистона 19, отцовски импринтированного гена, наблюдалось почти через год после первого дня первоначального лечения у одного пациента с диагнозом анапластической олигодендроглиомы. После введения противоопухолевых препаратов сообщалось о снижении экспрессии ДНК-метилтрансфераз и нарушении паттернов метилирования ДНК в сперматозоидах грызунов. Гипометилирование в цитозингуаниновых динуклеотидных областях является наиболее частым изменением, наблюдаемым после лечения доксорубицином [230; 231]. Поэтому статус метилирования ДНК этих областей может быть использован для ранней диагностики токсического действия на гонады.

Несколько исследований показали, что поддержание метилирования ДНК необходимо для обеспечения успешного развития мужских половых клеток и эмбрионов на моделях грызунов [101]. Несмотря на стирание эпигенетических сигнатур при перепрограммировании развития, некоторые отцовские эпигенетические aberrации, индуцированные противоопухолевым лечением, сохраняются и могут повлиять на развитие потомства.

Таким образом, бесплодие является одним из потенциальных неблагоприятных побочных эффектов лечения рака. Эпидемиологические и экспериментальные исследования многочисленны и четко описывают риск бесплодия после противоопухолевой терапии, особенно у мужчин, которым был поставлен диагноз в зрелом возрасте. Недавние исследования повысили осведомленность о чувствительности незрелой ткани яичек к воздействию химиотерапии и повышенном риске бесплодия у взрослых мужчин, получавших лечение в детстве, по сравнению с общей популяцией.

1.3 Дигидрокверцетин и его биологическая активность

Антиоксиданты представляют собой группу соединений, обладающих способностью нейтрализовать свободные радикалы – нестабильные молекулы, способные повреждать клетки организма и вызывать различные заболевания. Эти вещества играют важную роль в поддержании здоровья и профилактике различных заболеваний, включая сердечно-сосудистые болезни, рак и возрастные изменения. Антиоксиданты содержатся в продуктах питания, особенно в овощах и фруктах, а также могут поступать в организм в виде пищевых добавок. Основные природные источники включают витамины С и Е, бета-каротин, ликопин, полифенолы и другие соединения. Например, витамин С содержится в цитрусовых, ягодах и зеленых овощах, а витамин Е – в орехах, семенах и растительных маслах. Исследования показывают, что регулярное потребление продуктов богатых антиоксидантами связано с уменьшением риска сердечно-сосудистых заболеваний, рака и диабета. Исследования, проведенные в Европе и Японии, показали, что высокое потребление фруктов и овощей снижает риск ишемической болезни сердца и инсульта. Однако важно отметить, что польза от антиоксидантов зависит от типа и количества потребляемых веществ, а также индивидуальных особенностей организма [186; 229].

Биофлавоноид дигидрокверцетин является наиболее перспективным природным антиоксидантом. Исходным сырьем является древесина сибирской и

даурской лиственниц, которые растут в изобилии и могут обеспечить стабильные поставки [65]. Антиоксидантная активность дигидрокверцетина превосходит активность большинства распространенных антиоксидантов, таких как токоферолы (витамин Е) [56; 62] и каротиноиды (витамин А). Кроме того, дигидрокверцетин гораздо более устойчив к воздействию окисления и света. К полезным свойствам дигидрокверцетина можно отнести защиту капилляров печени. Задерживая свободные радикалы, дигидрокверцетин помогает защитить организм от неблагоприятных факторов внешней среды. Регулярное употребление дигидрокверцетина помогает поддерживать запасы антиоксидантов в организме человека. Истощение этих запасов может быть вызвано несбалансированным питанием и факторами окружающей среды, что приводит к возникновению окислительного стресса, который в свою очередь отражается в развитии патологических процессов. Суточная физиологическая потребность в биофлавоноидах (природных антиоксидантах) составляет 150–250 мг для детей старше 7 лет и 200–250 мг для взрослых [43]. Токсикологические исследования показали, что дигидрокверцетин не токсичен и не оказывает побочных эффектов на организм человека [21; 23]. Ежедневное употребление дигидрокверцетина помогает поддерживать физиологические функции организма на высоком уровне. Дигидрокверцетин был открыт в 1936 году американским биохимиком Альбертом. С тех пор его биологическая и антиоксидантная активность изучалась в течение нескольких десятилетий. Более активный, чем токоферол и каротин, он также является более стабильным.

Кроме того, дигидрокверцетин смог себя зарекомендовать как кардиопротектор при избыточной физической нагрузке на сердце как у спортсменов, так и у больных с ишемической болезнью сердца [30; 38; 48; 49], ангиопротектор [39; 48], также обладает противоопухолевым [54], иммуностимулирующим [22] и антимуtagenным эффектом [14; 26].

Одной из основных проблем в онкологии является резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам. Дигидрокверцетин был продемонстрирован в ряде исследований как средство, способствующее

повышению чувствительности опухолей к химиотерапевтическим агентам. Например, комбинированное применение дигидрокверцетина с препаратами, такими как доцетаксел и цисплатин, показало улучшение результатов лечения у пациентов с раком молочной железы и легких. Это связано с его способностью модулировать сигнальные пути, отвечающие за клеточную выживаемость и апоптоз [55; 57; 64]. Одним из важных преимуществ дигидрокверцетина является его способность уменьшать токсические эффекты химиотерапии. Исследования показывают, что дигидрокверцетин может защитить здоровые клетки от повреждения, вызванного свободными радикалами, которые возникают во время химиотерапии [20; 35; 61]. Это позволяет не только улучшить переносимость лечения, но и сохранить качество жизни пациентов. Дигидрокверцетин продемонстрировал эффективность в снижении метастатической активности опухолей. Он может воздействовать на механизмы клеточной адгезии и миграции, что позволяет уменьшить риск метастазирования [61]. Включение дигидрокверцетина в схемы лечения может стать ключевым моментом в профилактике распространения раковых клеток на другие органы и системы. Дигидрокверцетин также оказывает иммуностимулирующее действие. Он может активировать Т-клетки и усиливать их потенциальную способность уничтожать раковые клетки. Исследования показывают, что применение дигидрокверцетина в сочетании с химиотерапией может усилить антиметастатический эффект, побуждая иммунную систему к более активному воздействию на опухолевые клетки. Эффективность дигидрокверцетина в противоопухолевой терапии может быть увеличена при сочетании с другими натуральными веществами и традиционными медикаментами. Например, сочетание ДГК с экстрактами определенных трав или другими флавоноидами показывает синергический эффект, что может существенно повысить противоопухолевую активность таких схем терапии [59; 31; 62].

Дигидрокверцетин представляет собой многообещающую добавку к схемам противоопухолевой терапии. Его способности повышать эффективность

химиотерапии, уменьшать ее побочные эффекты и подавлять метастазирование делают его важным компонентом в разработке комплексных лечебных стратегий.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на базе кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО Амурская государственная медицинская академия Минздрава России, в период с 2021 по 2024 год.

2.1 Общая характеристика экспериментальных животных и распределение их по группам

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. Проведение исследования одобрено на заседании этического комитета ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России № 9 от 23.11.2020.

Для выявления общих закономерностей компенсаторно-приспособительных реакций эндокринного аппарата семенников исследование проводили на экспериментальном материале. В ходе эксперимента было использовано 90 половозрелых лабораторных крыс линии Wistar в возрасте 90 суток, массой 270–300 граммов. Из них выделили 3 группы: первая группа – контроль ($n = 10$), вторая и третья группы ($n = 80$) были разделены и составили 2 экспериментальные группы. Первая экспериментальная группа состояла из 40 крыс, получавших внутрибрюшинно комплекс препаратов СНОР. Вторая экспериментальная группа состояла также из 40 крыс, которым после введения препаратов СНОР, ежедневно с кормом добавляли дигидрокверцетин. Животных обеих экспериментальных групп изучали на 7-е, 14-е, 21-е и 35-е сутки (Таблица 1).

Для достижения поставленной цели половозрелым крысам (самцам), входившим в первую экспериментальную группу, внутрибрюшинно вводили комплекс СНОР: циклофосфан (Cyclophosphamide, «Бакстер Онкология ГмбХ» Германия) – 21 мг/кг, доксорубин (Doxorubicin, «Верофарм» Россия) –

2,1 мг/кг, винкристин (Vero-vincristin, «Верофарм» Россия) – 0,04 мг/кг, и преднизолон – 2,1 мг/кг. Выбранная доза является 1/5 LD50. Второй интактной группе после введения СНОР ежедневно с кормом был добавлен дигидрокверцетин в дозировке 10 мг/кг массы тела. Выбор данной схемы химиотерапии был обусловлен тем, что данные препараты являются базовыми и входят в большинство современных схем лечения злокачественных заболеваний. После профилактического осмотра животного и обработки поверхности передней брюшной стенки внутрибрюшинно дважды с интервалом 7 дней вводили препараты: циклофосфамид, разведенный в 0,25 мл воды для инъекций; адриамицин, разведенный в 0,25 мл 0,9 % растворе натрия хлорида; винкристин, разведенный в 0,02 мл 0,9 % растворе натрия хлорида; преднизолон, разведенный в 0,02 мл 0,9 % растворе натрия хлорида. При этом во время первого и второго введения количество препарата определяли из расчета: циклофосфамид – 21 мг/кг, винкристин – 21 мг/кг, адриамицин – 2,1 мг/кг, преднизолон – 2,1 мг/кг. Для верификации возникших в семенниках нарушений, из обеих экспериментальных групп умерщвляли по 10 случайных подопытных самцов крыс через 1 неделю после первого проведения химиопрепаратов и 3 интактных самцов крыс (Таблица 1).

Работа с животными осуществлялась в соответствии с ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Животные обеих экспериментальных групп содержались в одинаковых условиях вивария ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России, при температуре 22–24 °С и влажности 50–65 %.

Эвтаназия животных проводилась методом декапитации с соблюдением этических норм. Протокол эксперимента исследования на этапах содержания, моделирования и выведения животных из эксперимента соответствовал принципам биологической этики, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985), «Европейской конвенции о

защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ЕЭС, Страсбург, 1986), приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Далее производили забор крови и семенников.

Таблица 1 – Этапы проведения исследования

Сроки проводимого исследования	Этапы введения ПХТ	Этапы проведения цитологического исследования	Этапы проведения биохимического исследования	Этапы проведения гистологических методов исследования
1-е сутки	—	цитологическое исследование эпидидимальной суспензии	забор крови для исследования уровня гормонов: ЛГ, ФСГ, Тестостерон	забор материала животных интактной группы – 10
1-е сутки	введение 1-го курса ПХТ	—	—	—
7-е сутки	—	цитологическое исследование эпидидимальной суспензии	забор крови для исследования уровня гормонов: ЛГ, ФСГ, Тестостерон	забор материала животных экспериментальных группы – 20
7-е сутки	введение 2-го курса ПХТ	—	—	—
14-е сутки	—	цитологическое исследование эпидидимальной суспензии	забор крови для исследования уровня гормонов: ЛГ, ФСГ, Тестостерон	забор материала животных экспериментальных группы – 20
21-е сутки	—	цитологическое исследование эпидидимальной суспензии	забор крови для исследования уровня гормонов: ЛГ, ФСГ, еестостерон	забор материала животных экспериментальных группы – 20
35-е сутки	—	цитологическое исследование эпидидимальной суспензии	забор крови для исследования уровня гормонов: ЛГ, ФСГ, Тестостерон	забор материала животных экспериментальных группы – 20

Морфофункциональное состояние мужской репродуктивной системы экспериментальных животных оценивали комплексно с использованием морфологических, морфометрических, гистохимических, биохимических, физиологических и статистических методов исследования.

2.2 Морфологические методы исследования

Отпрепарированные семенники (отдельно правый и левый) взвешивали на торсионных весах. Далее определяли весовой индекс (относительную массу мужских половых желез), который представляет собой отношение массы органа к массе тела животного, выраженное в процентах. Затем семенники фиксировали в нейтральном 10 % забуференном формалине в течение нескольких суток в зависимости от размера органов, обезвоживали в спиртах восходящей крепости. Материал заливали в парафиновые блоки, ориентируя фрагменты параллельно плоскости среза. Производили резку готовых блоков на ротационном микротоме. Срезы монтировали на стекла, окрашивали гематоксилином и эозином [1; 2; 3; 4; 5, 34].

Для морфологических методов исследования использовали семенники животных опытных групп, которые составили 80 особей, а именно по 10 особей из каждой подгруппы на 7-е, 14-е, 21-е, 35-е сутки.

2.2.1 Морфометрическая характеристика сперматогенного эпителия семенников крыс экспериментальных групп

Оценку генеративной функции семенников производили с использованием ряда гистоморфометрических критериев стромального компонента и паренхимы мужской половой железы. В частности, измеряли такие показатели стромы, как толщина соединительнотканной капсулы (белочной оболочки) и площадь межканальцевой соединительной ткани семенников [58; 235]. Толщину

фиброзной оболочки определяли в 10 условных отрезках окружности среза органа. Площадь стромы определяли в 10 полях зрения.

При изучении паренхимы органа оценивали её площадь, представляющую собой срезы извитых семенных канальцев, а также производили подсчет количества канальцев на единицу условной площади. Измерения производили не менее чем в 10 полях зрения.

Проводили измерение площади поперечного сечения семенных извитых канальцев и толщины сперматогенного пласта. Для этого брали не менее 30 строго поперечных срезов извитых семенных канальцев, и толщину эпителиосперматогенного слоя в этих канальцах определяли по отрезкам на 3, 6, 9, 12 часов условного циферблата. Оценку гистоморфометрических параметров производили при увеличении $\times 100$ (об. $\times 10$; ок. $\times 10$) с использованием автоматизированной системы захвата и обработки изображения с программным обеспечением «micropictures», с последующим проведением компьютерной морфометрии с использованием «ImageScope».

Цитологический анализ клеток сперматогенного эпителия проводили при увеличении $\times 100$ (об. $\times 10$; ок. $\times 10$) из расчета на один извитой семенной каналец в 30 строго поперечных канальцах, с подсчётом клеток Сертоли, единственных соматических клеток извитых семенных канальцев.

Для анализа цитологического профиля сперматогенеза подсчитывали суммарное количество сперматогенных клеток канальцев, а также анализировали их субпопуляционный состав. Производили подсчет сперматогоний различной степени зрелости, а также их суммарное количество, число первичных и вторичных сперматоцитов, ранних и поздних сперматид и сперматозоидов.

В ходе эксперимента производили подсчет сперматозоидов как в составе сперматогенного пласта, так и в просвете извитого семенного канальца. При подсчете учитывали головки сперматозоидов, которые попали в срез.

Для оценки патоморфологических изменений яичек производили подсчет аномально измененных извитых канальцев, а именно канальцев со спущенным

эпителием и канальцев, содержащих гигантские, многоядерные клетки из расчета на 100 случайных канальцев.

Так же, в ходе эксперимента проводили подсчет ряда функциональных индексов являющихся, по мнению многочисленных исследователей, чувствительным индикатором состояния сперматогенеза. В первую очередь определяли: 1) индекс сперматогенеза, который представляет собой отношение числа слоев сперматогенного эпителия к числу подсчитанных канальцев (из расчёта на 100 случайных канальцев); 2) герминативный индекс высчитывали по отношению числа сперматогоний к числу sustentocитов; 3) клеточный индекс Сертоли, который равен отношению суммарного содержания зародышевых клеток различных типов, в том числе сперматогоний, сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов, к числу sustentocитов; 4) индекс зрелости сперматогенеза – это отношение числа суммарного содержания сперматогоний и сперматоцитов к суммарному содержанию сперматид и сперматозоидов. Для последних трёх показателей в расчет брались не менее 30 извитых семенных канальцев.

2.2.2 Морфометрическая характеристика эндокринного аппарата семенников крыс экспериментальных групп

О состоянии эндокринного аппарата семенников экспериментальных животных судили на основании анализа интерстициальных эндокриноцитов. Производили подсчет суммарного содержания клеток Лейдига, которые расположены в межканальцевой соединительной ткани, абсолютное и относительное количество клеток Лейдига в зависимости от их морфофункциональных типов, в том числе фракции активных и неактивных эндокриноцитов.

Учитывая, что объем ядер эндокриноцитов является одним из объективных признаков их стероидогенной активности, функционально активными эндокринными клетками яичек считали крупные или средних размеров клетки, округлой или полигональной формы, со светлыми ядрами. К неактивным клеткам

Лейдига относили малые веретенообразные, округлые или полигональные клетки. Подсчёт эндокриноцитов производили при увеличении $\times 400$ (об. $\times 40$; ок. $\times 10$) в 30 полях зрения из расчёта на единицу условной площади ($35\,520\text{ мкм}^2$).

Определяли объем клеток Лейдига (V_n) по формуле и выражали в мкм^3 :

$$V_n = 0,52 \times d1 \times d2,$$

где $d1$ – диаметр по короткой оси в микрометрах;

$d2$ – диаметр по длинной оси в микрометрах.

Вычисляли коэффициент морфофункциональной активности клеток Лейдига (K_a), по формуле, предложенной Макаровым И. Ю.:

$$K_a = (B + C) / M,$$

где B – большие клетки Лейдига;

C – средние клетки Лейдига;

M – малые клетки Лейдига.

Высчитывали коэффициент, отражающий отношение числа клеток Лейдига к количеству клеток Сертоли, коэффициент, равный числу клеток Лейдига, деленному на количество сперматогенных клеток [36].

2.3 Иммуногистохимическое исследование апоптоза и пролиферативной активности сперматогенных клеток семенников крыс экспериментальных групп

Для определения пролиферативной активности сперматогенных клеток на серийных гистологических препаратах семенников экспериментальных животных использовали первичные поликлональные антитела Ki-67 с докраской ядер гематоксилином по общепринятой методике.

Наличие клеток сперматогенного эпителия, вступивших в апоптоз, определяли выявлением экспрессии проапоптатического белка Caspase-3.

p53 – это белок, кодируемый геном TP53, выполняющий ключевую роль в регуляции клеточного цикла и предотвращении развития опухолей. Его называют «хранителем генома», поскольку он активируется в ответ на повреждения ДНК и стрессовые факторы, инициируя процессы репарации, остановки деления клеток или апоптоза (клеточной гибели).

CD117 (c-KIT) – рецептор тирозинкиназы экспрессирующийся преимущественно на поверхности сперматогоний типа А (самых ранних предшественников сперматозоидов). CD117 выступает в роли фактора дифференцировки мужских половых клеток.

Срезы инкубировали с первичными моноклональными антителами Ki67, Caspase-3, p53 и CD 117. Рабочую концентрацию антител определяли исходя из рекомендаций производителя на материале с достоверной экспрессией данных антител. Иммуногистохимическое окрашивание производили в иммуногистостейнере с использованием системы детекции. После проведения материала в иммуногистостейнере препараты подвергались дегидратации, просветлению и заключению под покровные стекла. Морфометрический анализ проводили на микроскопе при увеличении $\times 100$ (об. $\times 10$; ок. $\times 10$). Подсчет Ki-67, Caspase-3, p53 и CD 117-позитивных клеток, сперматогенного эпителия производили в полях зрения на единицу условной площади.

2.4 Иммуноферментный анализ плазмы крови крыс экспериментальных групп

Образцы крови помещали в вакуумные пробирки. Плазма крови была выделена методом центрифугирования при скорости вращения ротора 1 300 g в течение 10 мин. и впоследствии хранилась при температуре -20°C до проведения анализов. Концентрацию тестостерона, лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона измеряли иммуноферментным методом,

используя набор реагентов производства ООО «ХЕМА» (Москва), на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе Immunochem-2100 (производство США) согласно инструкции производителя.

2.5 Цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс экспериментальных групп

С целью подсчета мужских половых клеток зрелые сперматозоиды получали из отпрепарированных придатков семенников, путем их вскрытия на термостоле. Содержимое семенных извитых канальцев крыс в количестве 0,02 мл разводили в 0,4 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, подогретого предварительно до температуры 37 °С. Разведение эякулята производили путем многократного пипетрирования. Разведенный эякулят вводили в пространство между покровным стеклом и камерой Горяева, так чтобы эякулят заполнил все пространство равномерно. Затем в счетной камере Горяева производили подсчет сперматозоидов под микроскопом при увеличении $\times 100$ (об. $\times 10$; ок. $\times 10$) в больших квадратах по диагонали (количество используемых квадратов зависело от числа клеток) с последующим пересчетом для определения содержания сперматозоидов в единице объема (0,4 мл) эпидидимальной суспензии.

Подсчитывали абсолютное и относительное количество сперматозоидов в единице объема (0,4 мл) эпидидимальной суспензии с учетом характера их подвижности. Подвижность оценивали по общепринятой системе, а именно выделяли активно-подвижные (прямолинейно поступательные движения со спиральным вращением вокруг своей оси), слабо подвижные (манежное или круговое движение, при котором сперматозоиды вращаются вокруг своей головки или по небольшому кругу), «дергающиеся» (колебательное, местное движение, когда имеется движение хвоста, но не происходит перемещение сперматозоида), неподвижные (погибшие сперматозоиды, у которых отсутствует движение) сперматозоиды. При этом активно-подвижные и слабо подвижные относили к фертильной фракции, а «дергающиеся» и неподвижные – к нефертильной

фракции эпидидимальных сперматозоидов. Далее вычисляли индекс фертильности, который представляет собой отношение числа фертильных форм к нефертильным.

Для определения жизнеспособности сперматозоидов их подсчёт с учётом подвижности проводился в течение первого часа через каждые 15 минут, а в дальнейшем через каждые 30 минут до полной остановки всех сперматозоидов.

Для оценки патологических форм подсчитывали абсолютное и процентное содержание сперматозоидов в единице объема (0,4 мл) эпидидимальной суспензии с дефектами головки, шейки, средней части и хвостиков при световой микроскопии при увеличении $\times 100$ (об. $\times 10$; ок. $\times 10$).

2.6 Методы статистической обработки

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Statistica 13.3 for Windows (StatSoft США) и Excel 2021. Учитывая небольшой размер выборок, использовали непараметрические критерии. Для количественных признаков рассчитывали следующие показатели описательной статистики: медиану (Me) и квартили (Q1; Q3). В тех случаях, когда переменная содержала большое количество одинаковых значений, медиана и квартили были дополнены средней арифметической (M) и стандартной ошибкой (m). Для сравнения трех независимых групп по количественному признаку использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Для сравнения трех независимых групп по качественному признаку использовали непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона, при малом количестве наблюдений использовали точный критерий Фишера.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Морфофункциональное состояние семенников крыс после проведения химиотерапии на 7–14-е сутки

3.1.1 Морфологическая характеристика семенников крыс

Масса семенников в различные периоды постнатального онтогенеза, является одним из немаловажных показателей становления мужской репродуктивной системы, динамика изменений весовых показателей в зависимости от возрастных периодов, хорошо изучена как у человека, так и у лабораторных животных, включая крыс.

В рамках проведенного исследования сформировали две экспериментальные группы: первая группа крыс подвергалась двукратному введению комплекса препаратов, включенных в протокол СНОР с интервалом в неделю, вторая группа одновременно с химиотерапией ежедневно получала антиоксидант – дигидрокверцетин. Для изучения динамики морфометрических показателей ткани семенников отобрали два временных периода наблюдения – 7-е и 14-е сутки.

При макроскопическом исследовании половые железы были овальной, несколько сплюсненной с боков формы, серовато-красного цвета, с полнокровными сосудами. Ткань семенников от серовато-розового до серо-бордового цвета.

В результате эксперимента установлена закономерность снижения массы, размеров и объёма семенников у животных, получивших химиотерапию. Уже на седьмые сутки наблюдалось незначительное падение показателя (–2,31 %), однако повторное введение препаратов привело к значительному снижению массы семенников (–17,92 %). Добавление дигидрокверцетина позволило частично нивелировать этот эффект: разница между группами составила ~ 5,9 %. Эти

данные подчеркивают потенциальную роль антиоксидантов в защите ткани семенников от цитостатической нагрузки.

При микроскопическом исследовании семенников крыс, проведенное на 7-е и 14-е сутки после начала эксперимента, продемонстрировало сходные патологические изменения: утолщение белочной оболочки, усиление кровенаполнения и развитие отека органа (Рисунок 1). После второго курса химиотерапии отек становился более выраженным, происходила гиалинизация коллагеновых волокон и разрушение эластического слоя. Изображение на Рисунке 3 показывает, что во всех исследуемых интервалах наблюдается утолщение фиброзной капсулы, причем показатели толщины капсулы в первой экспериментальной группе существенно превышают аналогичные значения у животных, получавших антиоксидант.

Кроме того, просвет микрососудов оказался расширенным, стенки сосудов подверглись деструкции, во многих сосудах отмечаются признаки нарушения сосудистой проницаемости, сопровождавшиеся выходом клеток крови в окружающие ткани, развитием явлений стаза и сладж-синдрома, интенсивность которого зависела от дозы введенных препаратов. Уровень кровенаполнения сосудов стромы семенников у крыс первой экспериментальной группы статистически значимо превосходил соответствующие показатели контрольной и второй экспериментальной группы.

Количество эластичных компонентов заметно снижается из-за дистрофических процессов и разрушения. Фибротические очаги характеризуются накоплением сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ), свидетельствующих о процессе формирования новых фибрилл. Такие склеротические изменения вызывают компрессию и сужение просвета семенных канальцев, расположенных по периферии [19].

Структура стенок семенных канальцев претерпевает заметные изменения: стенка становится толще, часто расслаивается, её базальная мембрана и внешняя оболочка подвергаются процессу гиалиноза. Толщина стенки канальцев у экспериментальных животных после второго курса химиотерапии отличается от аналогичных показателей контрольной группы ($p < 0,05$), однако практически

идентична показателям второй экспериментальной группы (Рисунок 2).

Анализируя данные, представленные в Таблице 2, можно видеть, что наибольший объем межканальцевой соединительной ткани отмечается на 14-е сутки эксперимента в обеих исследуемых группах. Важно подчеркнуть следующее различие между группами: площадь паренхимы у самцов крыс первой экспериментальной группы оказалась существенно меньше, нежели у особей второй группы, получавших антиоксидант, показатели соединительнотканного компонента оказались значительно выше у животных первой группы по сравнению с контролем (Рисунок 3).

Таблица 2 – Динамические изменения объемно-весовых параметров семенников крыс контрольной и экспериментальных групп (7–14-е сутки) (Ме)

Показатель	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальной группы			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДГК	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДГК
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
$m_{ж}, г$	286 (284,25; 297,25) $P_1 < 0,01$	276,5 (274,5; 280,5)	280,5 (277,3; 283,0) $P_3 < 0,01$	272 (269,25; 274,00) $P_4 < 0,01$; $P_5 < 0,01$	275,5 (272,5; 279,5) $P_6 < 0,01$
$m_c, г$	1,73 (1,70; 1,76) $P_1 < 0,01$	1,69 (1,66; 1,72)	1,71 (1,69; 1,72) $P_3 < 0,01$	1,42 (1,39; 1,45) $P_4 < 0,01$; $P_5 < 0,01$	1,53 (1,50; 1,55) $P_6 < 0,01$
Весовой индекс, %	0,604 (0,593; 0,623)	0,611 (0,587; 0,615)	0,609 (0,591; 0,619)	0,522 (0,516; 0,531)	0,553 (0,535; 0,571)
$V, мм^3$	2 178 (1 296; 3 276)	1 944 (1 496; 2 470)	1 980 (1 530; 2 508)	1 530 (1 152; 1 980)	1 872 (1 360; 2 280)

Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; $m_{ж}$ – масса экспериментальных животных; m_c – масса семенников; V – объем; n – число наблюдений.

Полученные различия повлияли на коэффициент, характеризующий соотношение паренхиматозного и стромального компонента семенников (Таблица 3), демонстрируя снижение данного показателя. Такие изменения свидетельствуют о сокращении размера и числа семенных извитых канальцев.

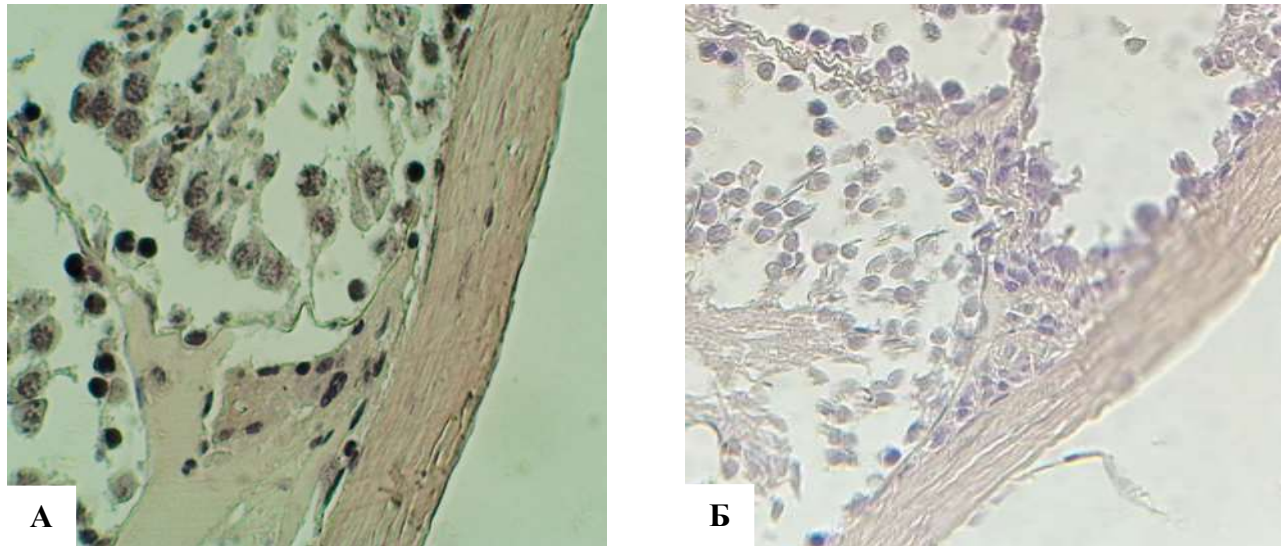


Рисунок 1 – Характеристика белочной оболочки животных экспериментальных групп: А – семенник крысы первой экспериментальной группы на 7-е сутки после первого курса ПХТ: утолщение белочной оболочки, отёк стромы, отслоение сперматогенного эпителия от оболочки канальцев; Б – семенник крысы второй экспериментальной группы на 14-е сутки после первого курса ПХТ: утолщение белочной оболочки, разволокнение базальной мембраны, отслоение сперматогенного эпителия, единичные сперматозоиды в просвете семенного извитого канальца, очаговый синдром клеток Сертоли. Гем и эозин, ув. $\times 40$

В Таблице 3 представлена зависимость значения стромально-паренхиматозного соотношения от количества курсов, применяемых при терапии гемобластозов: увеличение количества курсов сопровождается снижением величины коэффициента, отражающего долю паренхимы относительно стромы. При регулярном применении натурального

биофлавоноида дигидрокверцетина значение коэффициента практически совпадает с показателями контрольной группы.

Таблица 3 – Динамические изменения стромально-паренхиматозного соотношения у животных контрольной и экспериментальных групп (7–14-е сутки)

Показатель	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДГК	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДГК
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Площадь паренхимы					
Абс. П ($\times 10^4$ мкм ²)	53 (50; 54)	50 (48; 54)	51 (47; 53)	47 (46; 49) P ₄ < 0,01	49 (48; 50) P ₆ < 0,01
%	87,02 (86,67; 89,12)	85,76 (85,56; 86,12)	86,29 (85,76; 86,46)	83,17 (82,88; 83,33)	85,87 (84,71; 86,43)
Площадь стромы					
Абс. С ($\times 10^4$ мкм ²)	7,9 (6,1; 8,3)	8,3 (8,1; 8,7) P ₁ < 0,01	8,1 (7,8; 8,3)	9,7 (9,5; 9,8) P ₄ < 0,01	8,0 (7,8; 8,8)
%	12,97 (10,87; 13,32)	14,24 (13,87; 14,43) P ₁ < 0,01	13,71 (13,54; 14,24) P ₃ < 0,01	16,83 (16,7; 17,23) P ₄ < 0,01	14,13 (13,48; 15,29) P ₅ < 0,01 P ₆ < 0,01
К	6,7 (6,51; 8,19)	6,02 (5,92; 6,2) P ₁ < 0,01	6,29 (6,02; 6,38) P ₃ < 0,01	4,84 (4,8; 5,0) P ₄ < 0,01	6,12 (5,68; 6,15) P ₄ < 0,01 P ₆ < 0,01
Примечание: P ₁ – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P ₂ – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P ₃ – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P ₄ – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P ₅ – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P ₆ – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; К – отношение паренхимы к строме; n – число наблюдений.					

Структура стенок семенных канальцев претерпевает заметные изменения: стенка становится толще, часто расслаивается, её базальная мембрана и внешняя оболочка подвергаются гиалинозу. Толщина стенки канальцев у экспериментальных животных после второго курса химиотерапии отличается от аналогичных показателей контрольной группы ($p < 0,05$), однако практически идентична показателям второй экспериментальной группы (Рисунок 2).

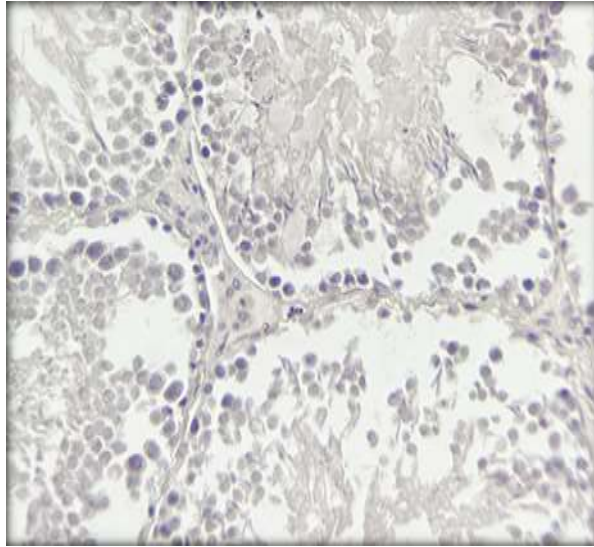
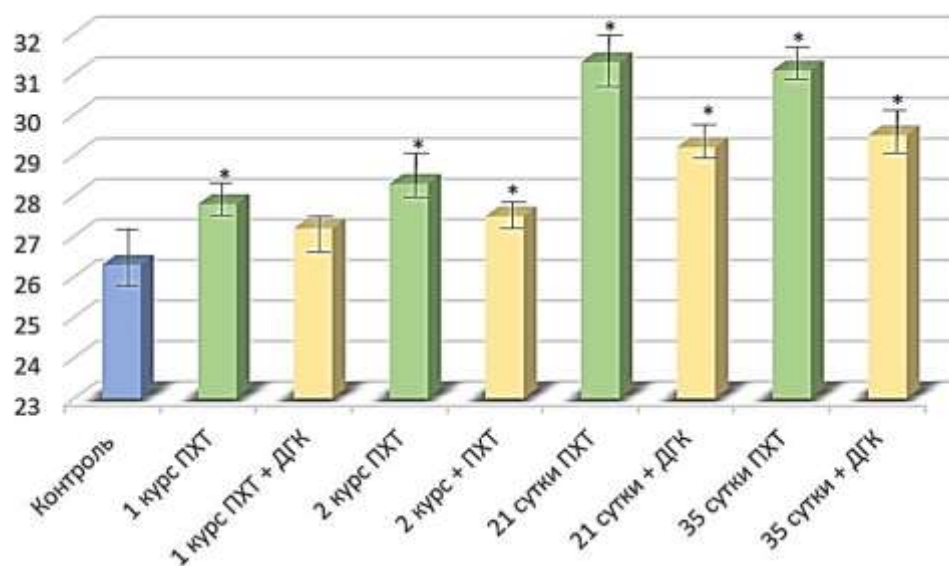


Рисунок 2 – Семенник крысы 2-й экспериментальной группы, 7-е сутки. Отслоение сперматогенного эпителия от оболочки канальцев, разрыхление и истончение сперматогенного эпителия, утолщение и разволокнение базальной мембраны, синдром клеток Сертоли, выраженный отек стромы, уменьшение количества клеток Лейдига, сопровождающееся кариопикнозом.

Гем и эозин. Ув. $\times 40$



Примечание: вертикальные отрезки соответствуют первому (Q1) и третьему (Q3) квартилям; * – результаты статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Рисунок 3 – Толщина соединительнотканной капсулы яичек экспериментальных животных

Резюме. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР оказывает выраженное негативное воздействие на морфофункциональное состояние и объемно-весовые показатели семенников у экспериментальных животных. Наблюдалось достоверное снижение массы и объема семенников, сопровождающееся утолщением белочной оболочки, гиалинозом коллагеновых волокон, деструкцией эластического каркаса, усилением васкуляризации, развитием отека, а также признаками сладж-синдрома и стаза. Кроме того, выявлено увеличение доли стромального компонента на фоне уменьшения паренхиматозной ткани, что свидетельствует о значительном угнетении репродуктивной функции. Применение антиоксиданта дигидрохверцетина во второй экспериментальной группе позволило частично компенсировать повреждающее действие химиотерапии.

3.1.2 Морфометрическая характеристика и иммуногистохимическое исследование сперматогенного эпителия крыс экспериментальных групп

Наблюдаемые структурные изменения в оболочках семенных канальцев характеризуются нарушением целостности гематотестикулярного барьера, следствием которого становятся выраженные дистрофические процессы в половых клетках.

При анализе состояния семенников крыс, подвергшихся двум циклам химиотерапевтического воздействия, установлено значительное уменьшение среднего диаметра и площади строго поперечного сечения семенных канальцев по сравнению с контрольной группой. Это обусловлено утолщением и гиалинозом базальной мембраны и внешней оболочки канальцев. Показатели структурных изменений у данной группы не отличались значимо от результатов, полученных у животных, дополнительно получавших дигидрокверцетин.

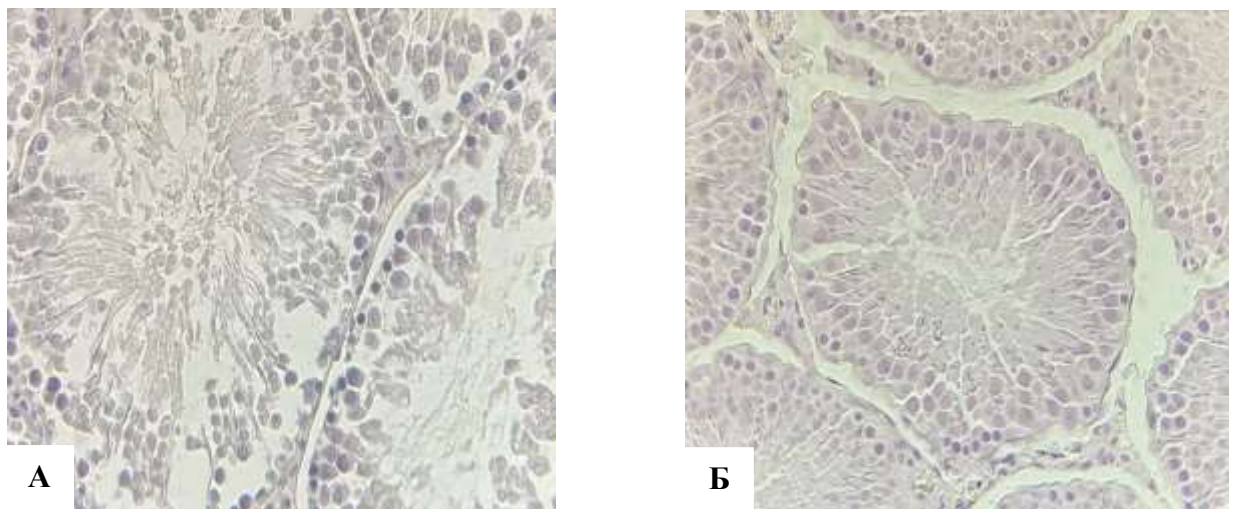


Рисунок 4 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы, 7-е сутки. Уменьшение толщины сперматогенного эпителия, в просвете семенного извитого канальца единичные поврежденные сперматозоиды; гем и эозин; ув. $\times 40$; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы, 7-е сутки. Формирование четких контуров клеток сперматогенного эпителия; гем и эозин; ув. $\times 25$

Нарушения структуры выявляются и в самих извитых семенных канальцах. После однократного курса химиотерапии толщина сперматогенного эпителия снижается примерно вдвое (до 2,09 раз) и составляет около 70 % исходного уровня, во второй экспериментальной группе в среднем в 1,42 раза, что имеет высокую степень статистической значимости ($p < 0,01$) по отношению к контролю. Повторный курс химиотерапии ведет к уменьшению толщины сперматогенного слоя почти втрое (в 3,14 раза) и двукратному падению во второй экспериментальной группе (2,06 раза), также сопровождаемым высокой степенью статистической значимости ($p < 0,01$) (см. Рисунок 4).

Результатом общего токсического эффекта введенной химиотерапии является тотальное разрушение сперматогенного эпителия: исчезновение зародышевых клеток различных стадий развития, хаотичное распределение оставшихся половых клеток с утратой четкости границ и нормальной ориентации (Рисунок 5).

Клетки, подверженные процессу десквамации, часто утрачивают нормальную структуру: их цитоплазма становится слабо окрашенной, приобретает признаки вакуолизации. Ядерные элементы таких клеток подвергаются резкой конденсации хроматина, иногда представляя собой гиперхромные глыбки. Просвет большинства семенных канальцев содержит крайне редкие, отдельные экземпляры повреждённых сперматозоидов (Рисунок 5).

Выявленные нарушения структуры сперматогенного эпителия прямо связаны с повышением объемов вводимых препаратов. После повторных курсов химиотерапии наблюдается резкое возрастание доли половых клеток, претерпевших дегенеративные изменения. В них появляется характерная вакуолизация и гранулированное набухание цитоплазмы (Рисунок 7).

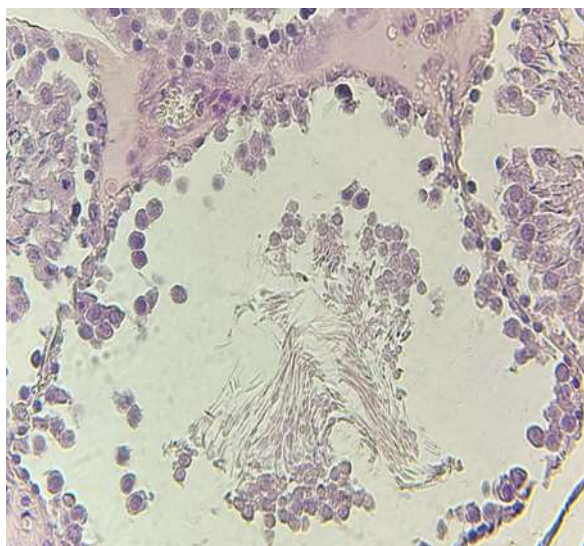


Рисунок 5 – Семенник крысы первой экспериментальной группы 14-е сутки. Десквамация сперматогенного эпителия, синдром клеток Сертоли, выраженный отек стромы. Гем и эозин. Ув. $\times 40$

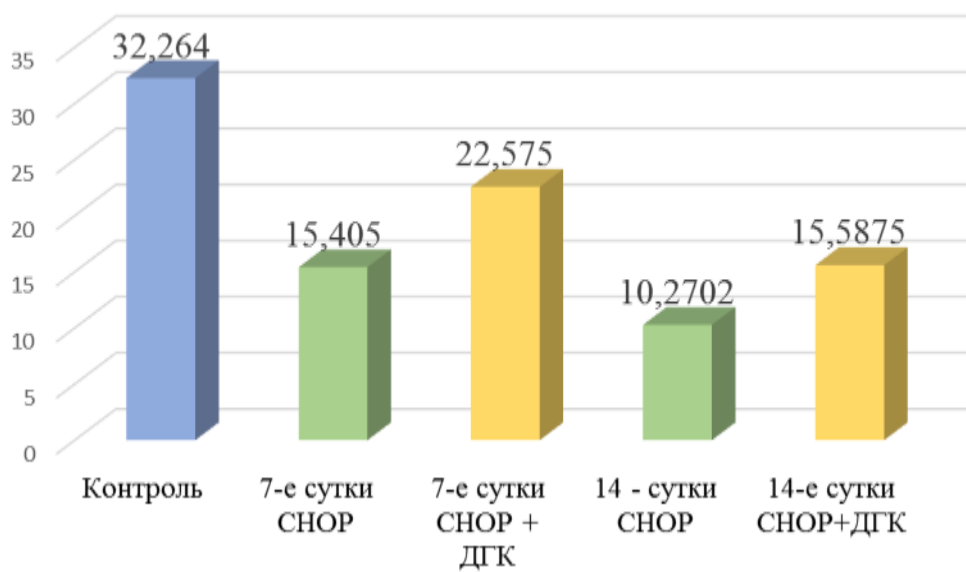


Рисунок 6 – Динамические изменения толщины сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп (мкм)

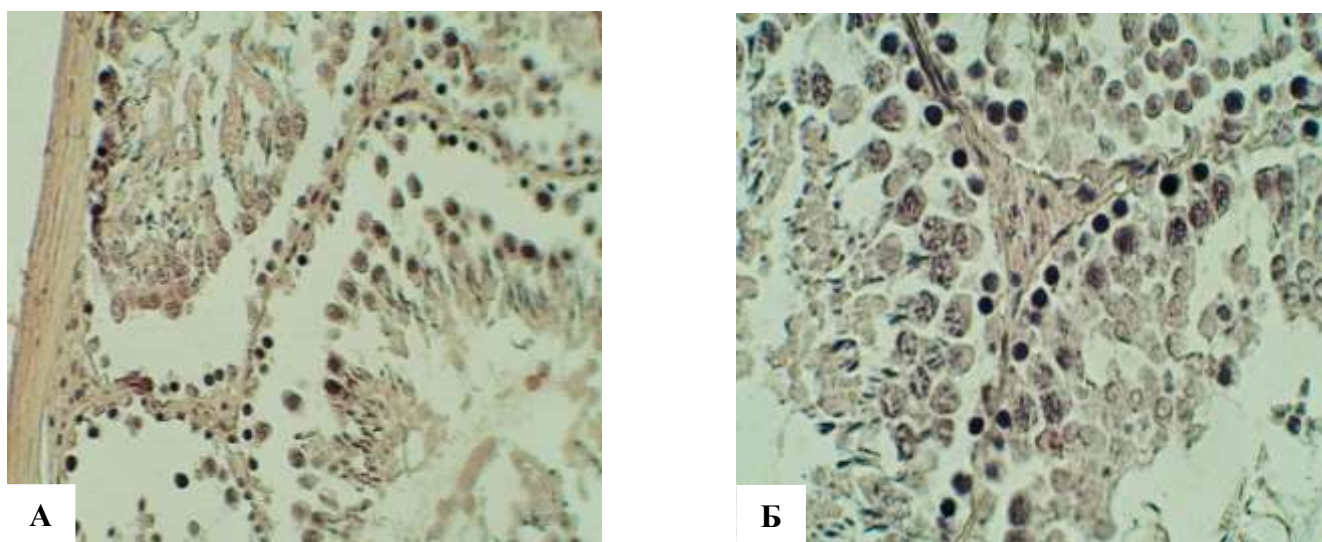


Рисунок 7 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп после повторного курса химиотерапии: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы на 14-е сутки, после повторного курса ПХТ; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы на 14-е сутки, после повторного курса ПХТ с ежедневным приемом антиоксиданта. Ядра клеток сперматогенного эпителия представлены гиперхромными глыбками, в просвете единичные поврежденные сперматозоиды. Гем и эозин. Ув. $\times 40$

Таблица 4 – Динамические изменение толщины сперматогенного эпителия (7–14-е сутки)

Показатель	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДКГ	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДКГ
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
1	2	3	4	5	6
Толщина сперматогенного эпителия, мкм	32,26 (27,37; 38,35) $P_1 < 0,01$	15,41 (11,86; 17,18) $P_2 < 0,01$	22,57 (20,48; 27,81) $P_3 < 0,01$	10,27 (8,71; 12,02) $P_4 < 0,01$	15,58 (13,65; 18,54) $P_5 < 0,01$, $P_6 < 0,01$
Толщина стенки канальца, мкм	2,77 (2,44; 3,24) $P_1 < 0,01$	5,77 (4,64; 6,51) $P_2 < 0,01$	6,22 (4,63; 7,45) $P_3 < 0,01$	6,93 (5,57; 7,81) $P_4 < 0,01$	6,85 (5,22; 8,19) $P_5 < 0,01$, $P_6 < 0,01$

Продолжение Таблицы 4

1	2	3	4	5	6
D_K , мкм	122,73 (113,98; 156,14) $P_1 < 0,01$	100,22 (91,18; 11,68) $P_2 < 0,01$	108,53 (105,72; 118,23) $P_3 < 0,01$	80,05 (70,14; 93,96) $P_4 < 0,01$	96,24 (89,90; 99,08) $P_5 < 0,01$, $P_6 < 0,01$
S_K , мкм ²	11 828,61 (10 203,03; 18 499,63) $P_1 < 0,01$	8 543,90 (6 530,24; 12 190,12) $P_2 < 0,01$	9 245,93 (8 774,60; 10 972,61) $P_3 < 0,01$	7 493,55 (4 717,60; 9 566,01) $P_4 < 0,01$	8 405,39 (7 519,16; 9 143,84) $P_5 < 0,01$, $P_6 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; DK – внутренний диаметр семенного канальца; SK – площадь семенного канальца; n – число наблюдений.					

Просвет большинства семенных канальцев характеризуется заметным дефицитом одного или нескольких слоев зародышевых клеток, сперматогенный эпителий теряет компактность, его клетки располагаются рыхло, перестают плотно примыкать друг к другу, между клеточными элементами образуются видимые пространства, чётко очерчены клеточные границы, приводящие к существенному уменьшению общей толщины сперматогенного эпителия по сравнению с показателями контрольной группы (Рисунок 9).

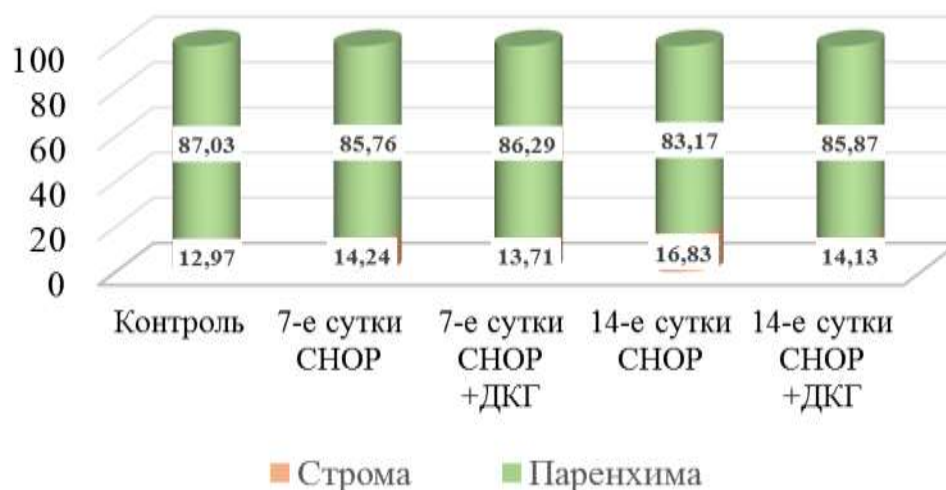


Рисунок 8 – Динамические изменения стромально-паренхиматозного соотношения семенников крыс экспериментальных групп (7–14-е сутки)

После первого цикла химиотерапии фиксировалась устойчивая тенденция к значимому уменьшению средней численности сперматогоний в обеих экспериментальных группах.

Сперматогонии в изучаемых образцах представлены округлыми либо полигональными формами, заполненными значительным количеством гранул, у ряда клеток обнаруживаются характерные вакуоли разнообразного размера и круглой конфигурации. Если сравнивать полученные результаты с показателями контрольной группы и группы, получавшей комбинацию SHOR и дигидрокверцетина, среднее число сперматогоний в одном семенном канале уменьшается в два и полтора раза соответственно, причем разница является статистически достоверной ($P < 0,01$).

Также индекс сперматогенеза значительно понижается ($P_1 < 0,01$) по сравнению с контрольной группой и группой, использовавшей сочетание SHOR и дигидрокверцетин.

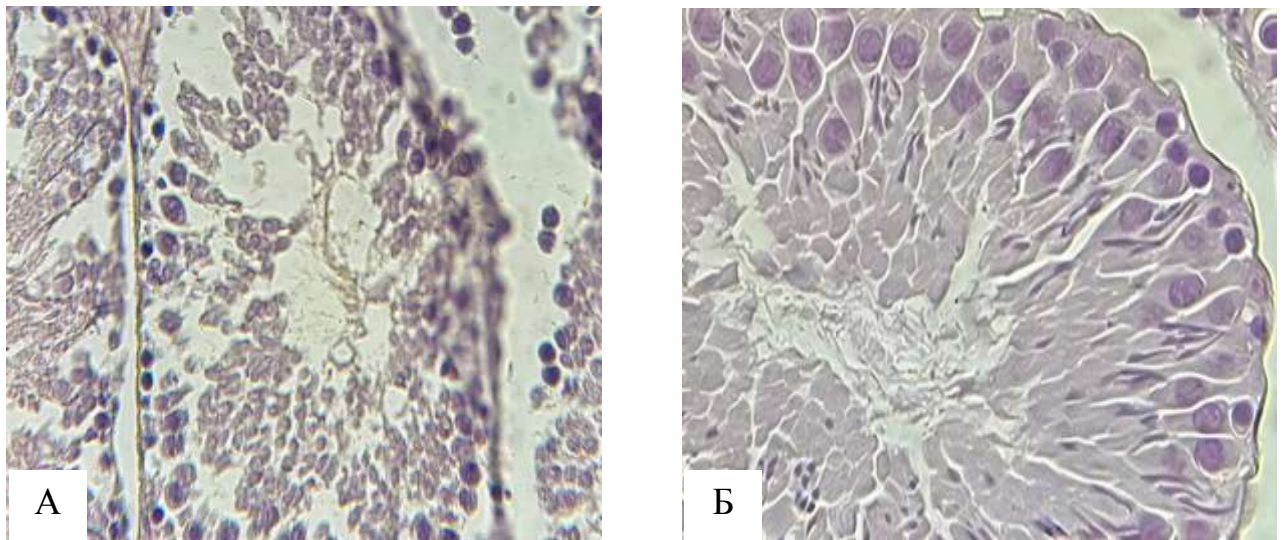


Рисунок 9 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп после повторного курса химиотерапии: А – семенник крысы первой экспериментальной группы после повторного введения комплекса противоопухолевых препаратов на 14-е сутки. Отмечаются единичные клетки сперматогенного эпителия. Гем и эозин. Ув. $\times 25$; Б – семенник крысы второй экспериментальной группы на 14-е сутки после повторного введения комплекса противоопухолевых препаратов. Формирование промежутков в виде пустот, с образованием четких межклеточных границ. Гем и эозин. Ув. $\times 40$

Отмечено падение рассчитанного индекса спермиоцитов, основанного на учете клеток Сертоли, с уровнем статистической значимости ($P < 0,01$) по сравнению с контрольной группой и животными, получавшими антиоксидант. Данные морфометрии канальцевого аппарата яичек приведены в Таблице 4.

Животные, которым дважды вводились препараты против гемобластозов, демонстрировали картину, известную как «синдром клеток Сертоли»: полное отсутствие любых элементов сперматогенного эпителия (см. Рисунки 5 и 9А).

Несмотря на относительную устойчивость клеток Сертоли к воздействию химиопрепаратов, нами выявлены отчетливые морфологические трансформации этих клеток, проявившиеся признаками дистрофии. Их ядра приобрели удлиненную плоскую форму с неправильными очертаниями. Количество сустентоцитов с яркими ядрами статистически значимо снизилось в обеих опытных группах ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной выборкой.

Исследование сперматогенного эпителия показало, что после первичного введения химиопрепаратов в первой группе произошло сокращение среднего числа сперматогенных клеток на 44,9 % и на 41,4 % во второй. Повторное введение химиопрепаратов привело к дополнительному уменьшению числа сперматогенных клеток: на 50,41 % в первой группе и на 49,16 % в группе, получавшей антиоксидант (Рисунок 10).

После однократного введения химиопрепаратов в группе без антиоксидантов было снижение сперматогоний на 3,6 %, в группе с антиоксидантом количество сперматогоний уменьшалось на 4,7 %. После повторного курса химиотерапии количество сперматогоний уменьшалось в первой группе на 11 %, во второй группе на 8,8 % (Рисунок 11).

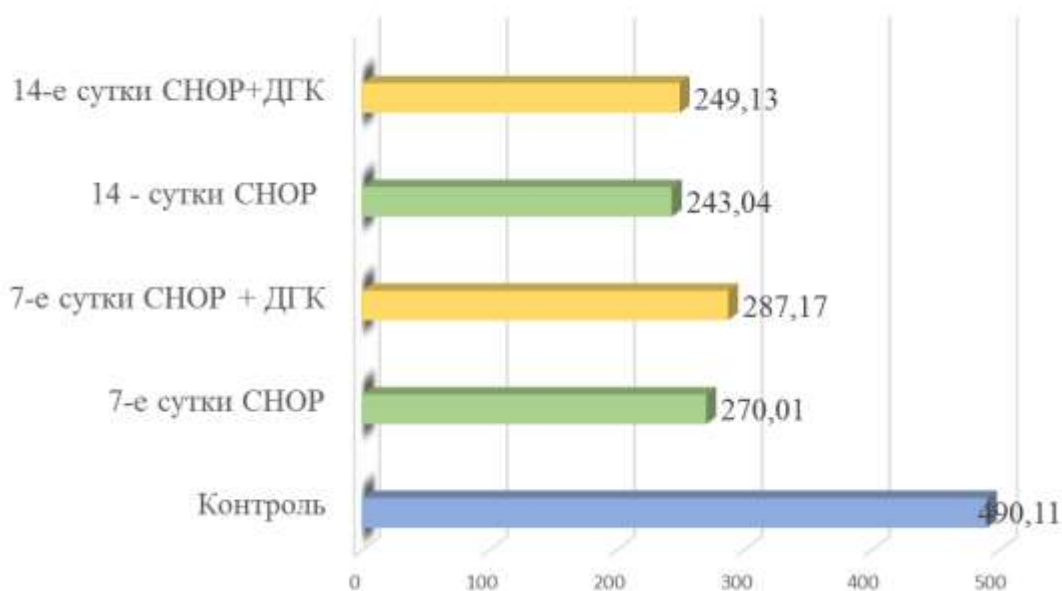


Рисунок 10 – Динамические изменения среднего количества сперматогенных клеток в канальце исследуемых животных (7–14-е сутки)



Рисунок 11 – Динамические изменения среднего количества сперматогоний на поперечном срезе канальце после проведения химиопрепаратов (7–14-е сутки)

Снижение сперматозоидов после первого курса в первой группе на 32,78 %, во второй – на 28,75 %, после повторного курса – на 42,59 % и на 37,58 %.

Снижение сперматид после первого курса в первой группе на 49,31 %, во второй группе – на 40,75 %, после повторного курса – на 56,1 %, во второй – на 51,68 %. Снижение сперматозоидов после первого курса в первой группе на 59,39 %, во второй – на 60,98 %, после повторного курса – на 58,3 %, во второй – на 64,22% (Рисунок 12).

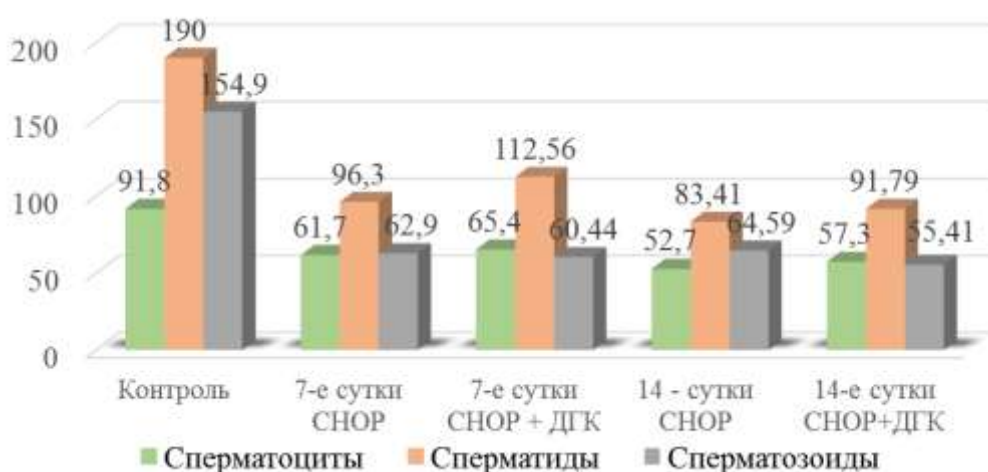


Рисунок 12 – Динамические изменения среднего количества сперматоцитов, сперматид, сперматозоидов после проведения химиопрепаратов (7–14-е сутки)

Полученные результаты демонстрируют динамические изменения показателей пролиферации и апоптотической активности на 7–14-е сутки исследования.

Маркер Ki-67 (маркер пролиферативной активности): в обеих экспериментальных группах отмечалась слабоположительная реакция на антитела к Ki-67 в ядрах единичных сперматогоний «+». В клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках иммуномечения на Ki-67 не обнаружено «–». В первой экспериментальной группе на 7-е сутки отмечалось достоверное падение уровня Ki-67 с 14,3 % до 3,1 % ($P < 0,01$), во второй экспериментальной группе с 14,3 % до 4,2 % ($P < 0,01$), что указывает на глубокое угнетение пролиферативной активности. После повторного курса на 14-е сутки также отмечалось угнетение пролиферативной активности, в первой экспериментальной группе с 14,3 % показатель снижался до 2,6 %, во второй группе до 3,5 %.

Маркер p53 (белок проапоптотической активности): в обеих экспериментальных группах отмечалась положительная реакция на антитела p53 отмечалась в сперматогониях «++», в клетках Лейдига и миоидных клетках экспрессии p53 не обнаружено «–». В первой экспериментальной группе отмечалось достоверное увеличение уровня p53 с 4,1 % до 16,7 % ($P < 0,01$), во второй экспериментальной группе также отмечалось достоверное увеличение с 4,1 % до 15,3 %. Повторный курс противоопухолевой терапии сопровождался еще большим увеличением уровня p53 с 4,1 % до 18,3 % в первой экспериментальной группе ($P < 0,01$), и с 4,1 % до 16,5 % во второй экспериментальной группе ($P < 0,01$) (Рисунок 13).

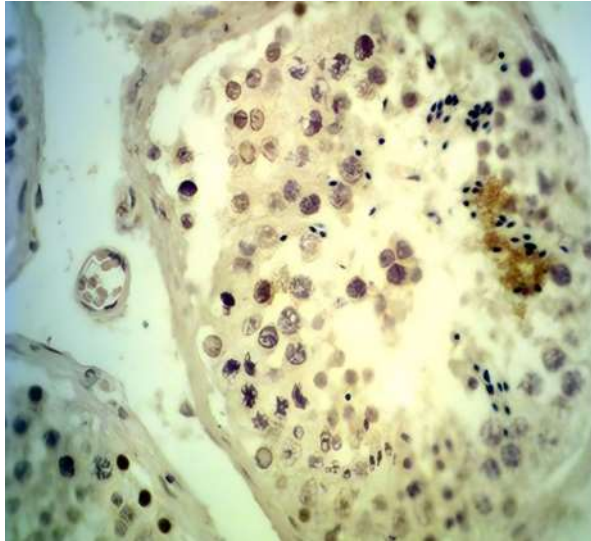


Рисунок 13 – Семенник крысы первой экспериментальной группы 14-е сутки. Интрануклеарная реакция с p53 средней интенсивности в отдельных клетках сперматогенного эпителия (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 40$)

Caspase-3 (маркер апоптотической активности): в извитых семенных канальцах животных обеих экспериментальных групп при блоке созревания отмечалась положительная иммунная реакция на caspase-3 в цитоплазме сперматогоний «++», в клетках Лейдига и в миоидных клетках экспрессия caspase-3 не выявлено «–». Активность маркера caspase-3 достоверно повышается уже после первого курса химиотерапии у животных из обеих экспериментальных групп. В первой экспериментальной группе отмечалось повышение с 5,3 % до 16,2 %, во второй экспериментальной группе – с 5,3 % до 15,2 %. После повторного курса химиотерапии на 14-е сутки тенденция к достоверному увеличению уровня caspase-3 сохранялась: с 5,3 % до 18,7 % в первой экспериментальной группе и с 5,3 % до 16,9 % во второй экспериментальной группе (Рисунок 14).



Примечание: Треугольником обозначена миоидная клетка; желтым цветом – сперматогония («++»); красным – сперматоцит I («-»); зеленым – сперматоцит II («++»).

Рисунок 14 – Семенник крысы первой экспериментальной группы 14-е сутки. Положительная реакция с caspasa-9 (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 100$)

CD117 (фактор дифференцировки мужских половых клеток): экспрессии маркера CD117 в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках не обнаружено («-»). Наблюдался резкий спад количества клеток, экспрессирующий CD 117, уже после первого курса химиотерапии. В первой экспериментальной группе отмечалось статистически значимое снижение экспрессии с 13,4 % до 2,3 %, во второй экспериментальной группе с 13,4 % до 3,7 %. После повторного курса отмечалось достоверное снижение с 13,4 % до 1,7 % в первой группе, и до 2,9 % во второй экспериментальной группе, отражая нарушение процесса обновления популяции предшественников сперматогоний.

Резюме. Полученные данные свидетельствуют о структурных изменениях в семенниках экспериментальных животных, вследствие двукратного применения комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР. Установлено, что комплекс химиопрепаратов нарушает целостность гематотестикулярного барьера, вызывая развитие дистрофии в половых клетках и деструкции сперматогенного эпителия.

Однократный цикл химиотерапии приводил к двукратному снижению толщины сперматогенного эпителия, тогда как повторный курс привел к снижению толщины сперматогенного эпителия втрое, что сопровождалось высоким уровнем статистической значимости ($p < 0,01$). Комплекс препаратов, используемых в рамках протокола СНОР, провоцирует поражение половых клеток на всех стадиях дифференцировки, включая потерю зародышевых клеток, дезорганизацию расположения сохранившихся клеток, наличие дистрофических изменений в цитоплазме и ядрах пораженных клеток. Несмотря на относительную устойчивость клеток Сертоли к воздействию указанных препаратов, в них также происходят дистрофические процессы, такие как деформация ядер и искажение их контуров. Применение дигидрокверцетина частично нивелировало токсическое действие комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР. Данные полученные при иммуногистохимическом исследовании показывают снижение пролиферативной активности и увеличение количества клеток, вовлечённых в апоптоз. Добавление антиоксиданта – дигидрокверцетина – приводило к снижению токсического действия препаратов противоопухолевой терапии.

Таблица 5 – Динамические изменения сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп из расчета на один семенной каналец (7–14-е сутки) (Ме)

Параметры	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		СНОР 7-е сут.	ДГК 7-е сут.	СНОР 14-е сут.	ДГК 14-е сут.
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Сперматогенные клетки	490,05 (481,61; 497,28) $P_1 < 0,01$	270,01 (264,32; 274,18) $P_2 < 0,05$	287,17 (280,85; 292,64) $P_3 < 0,01$	243,04 (238,93; 247,25) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	249,13 (243,73; 253,32) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии (общ.)	53,31 (51,63; 55,45) $P_1 < 0,01$	49,04 (47,89; 50,58)	48,63 (47,31; 49,87) $P_3 < 0,01$	42,34 (41,02; 43,46) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	44,52 (43,28; 45,84) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии, %	10,87 (10,72; 11,14) $P_1 < 0,01$	18,16 (18,11; 18,44)	16,93 (16,84; 17,04) $P_3 < 0,01$	17,42 (17,16; 17,57) $P_4 < 0,01$	17,87 (17,75; 18,09) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии А	13,08 (12,67; 13,59) $P_1 < 0,01$	11,13 (10,62; 11,59)	10,74 (10,25; 11,19) $P_3 < 0,01$	10,11 (9,87; 10,68) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	11,07 (10,65; 11,73) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии В	40,22 (38,96; 44,31) $P_1 < 0,01$	37,91 (37,27; 38,99)	37,89 (37,06; 38,68) $P_3 < 0,01$	32,23 (32,14; 32,78) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	33,45 (32,63; 34,11) $P_6 < 0,01$
Сперматоциты	91,81 (89,36; 93,91) $P_1 < 0,01$	61,74 (60,04; 63,37) $P_2 < 0,05$	65,41 (63,24; 68,12) $P_3 < 0,01$	52,71 (50,84; 54,28) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	57,31 (55,38; 59,43) $P_6 < 0,01$
Сперматоциты, %	18,73 (18,55; 18,88) $P_1 < 0,01$	22,86 (22,71; 23,11)	22,77 (22,51; 23,27) $P_3 < 0,01$	21,69 (21,27; 21,95) $P_4 < 0,01$	23,01 (22,72; 23,46) $P_6 < 0,01$
Сперматиды (общ.)	190,01 (182,86; 196,26) $P_1 < 0,01$	96,32 (92,21; 99,47) $P_2 < 0,01$	112,56 (106,85; 117,21) $P_3 < 0,01$	83,41 (79,68; 87,42) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	91,79 (87,67; 95,68) $P_6 < 0,01$
Сперматиды, %	38,76 (37,96; 39,46) $P_1 < 0,01$	35,67 (34,88; 36,27) $P_2 < 0,01$	39,19 (38,04; 40,05)	34,31 (33,34; 35,26) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	36,84 (35,97; 37,77) $P_6 < 0,05$

Продолжение Таблицы 5

Ранние сперматиды	132,14 (128,43; 136,15) $P_1 < 0,01$	65,13 (63,71; 66,93) $P_2 < 0,01$	77,85 (75,72; 78,43) $P_3 < 0,01$	54,25 (52,95; 55,67) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	58,16 (55,04; 61,27) $P_6 < 0,01$
Поздние сперматиды	57,87 (54,43; 60,11) $P_1 < 0,01$	31,18 (29,11; 32,54) $P_2 < 0,05$	34,71 (31,13; 38,78) $P_3 < 0,01$	29,16 (26,73; 31,75) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	33,63 (32,63; 34,41) $P_6 < 0,01$
Сперматозоиды	154,92 (149,36; 161,03) $P_1 < 0,01$	62,91 (58,11; 68,04)	60,57 (58,46; 63,13) $P_3 < 0,01$	64,54 (61,43; 67,26) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	55,51 (51,27; 59,27) $P_6 < 0,01$
Сперматозоиды, %	31,21 (31,01; 32,38) $P_1 < 0,01$	23,296 (21,98; 24,81)	21,09 (20,81; 21,72) $P_3 < 0,01$	26,55 (25,71; 27,21) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,05$	22,28 (21,03; 23,39) $P_6 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

3.1.3 Морфометрическая характеристика эндокринного аппарата семенников крыс экспериментальных групп

При гистологическом исследовании эндокринного аппарата семенников крыс после двукратного введения комплекса химиопрепаратов наблюдалось утолщение белочной оболочки, полнокровие и отек стромы, утолщение стенок кровеносных сосудов, эластический слой подвергался разрушению, наблюдался отек в интерстициальных островках, диффузное разрастание соединительной ткани. В связи с выраженным отеком в ряде случаев после повторного курса противоопухолевых препаратов интерстициальные островки плохо определялись. В интерстиции определяли клетки Лейдига в виде скоплений, состоящих из 8–24 клеток, различных морфофункциональных типов: малые, средние, большие, среди которых преобладали клетки Лейдига малых размеров. Нарушение трофики органа приводило к сдавлению цитоплазмы эндокриноцитов, в результате чего клетки Лейдига средних размеров зачастую были представлены как сморщенные клетки, с ядром неправильной формы, с хроматином, имеющим глыбчатое расположение.

После однократного проведения курса химиотерапии в первой группе на 7-е сутки наблюдалось достоверное снижение эндокриноцитов среднего размера на 3 %, эндокриноцитов большого размера на 1 % и увеличение количества малых форм клеток Лейдига на 4 %, во второй экспериментальной группе показатель эндокриноцитов среднего размера был на 6 % ниже, чем в группе контроля, и на 2 % ниже, чем в первой экспериментальной группе (Рисунок 15).

После повторного введения комплекса противоопухолевых препаратов на 14-е сутки в обеих экспериментальных группах отмечались аналогичные изменения, а именно: в первой экспериментальной группе отмечалось уменьшение эндокриноцитов среднего размера на 8 %, во второй экспериментальной группе – на 7 % относительно группы контроля (Рисунок 15).

В отдельных клетках Лейдига отмечались вкрапления липофусцина (Рисунок 16), что подтверждало наличие атрофических изменений клеток и могло указывать на угнетение их функциональной активности.

Динамические изменения содержания тестостерона и лютеинизирующего гормона в плазме крови крыс группы контроля и экспериментальных групп отражены в Таблице 6.

В ходе эксперимента, на 7-е сутки у крыс обеих экспериментальных группы после введения комплекса химиопрепаратов, было отмечено снижение общего количества клеток Лейдига, уменьшение диаметра их ядра и объема, что коррелировало с увеличением популяции клеток малых форм на 4 и 6 % соответственно. Число функционально активных клеток средних и больших размеров, наоборот, было снижено (Рисунок 15).

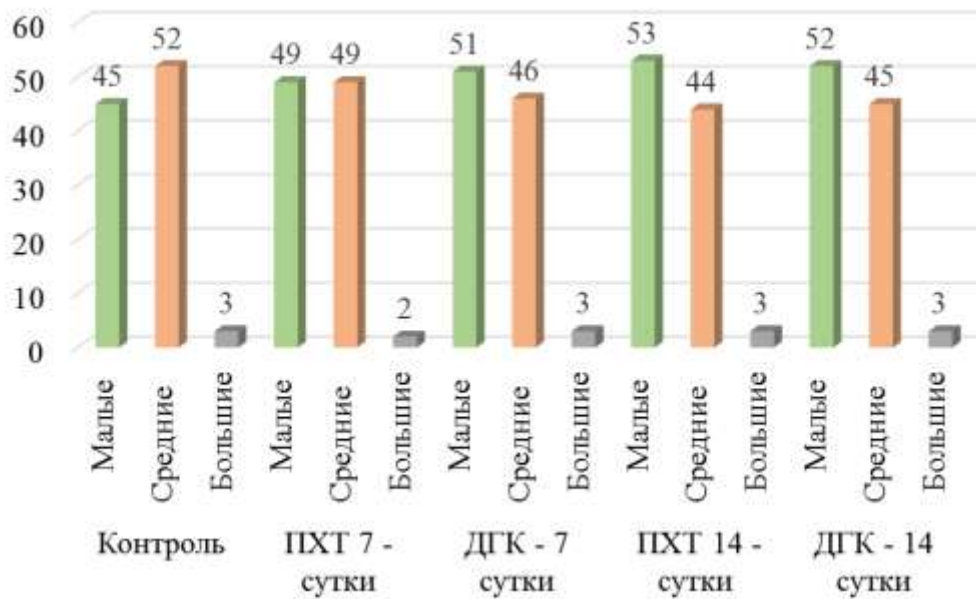


Рисунок 15 – Динамические изменения количества морфофункциональных форм клеток Лейдига СНОР (7–14-е сутки) (%)

После повторного проведения химиопрепаратов на 14-е сутки у крыс обеих экспериментальных групп сохранялась тенденция к уменьшению количества клеток Лейдига средних размеров на 8 и 7 % соответственно (Рисунок 15).

Результаты морфометрического исследования показали, что в клетках Лейдига у крыс первой экспериментальной группы после введения комплекса химиопрепаратов на 7-е сутки эксперимента уменьшился объем клеток на 18,96 % в сравнении с аналогичным показателем у крыс контрольной группы при уменьшении диаметра ядра на 1,61 % (Таблица 6). Общее количество клеток Лейдига снижалось на 15,74 %, что сопровождалось снижением концентрации тестостерона, на 52,4 % (Таблица 6), что в свою очередь коррелировало со снижением индекса активности (Таблица 6).

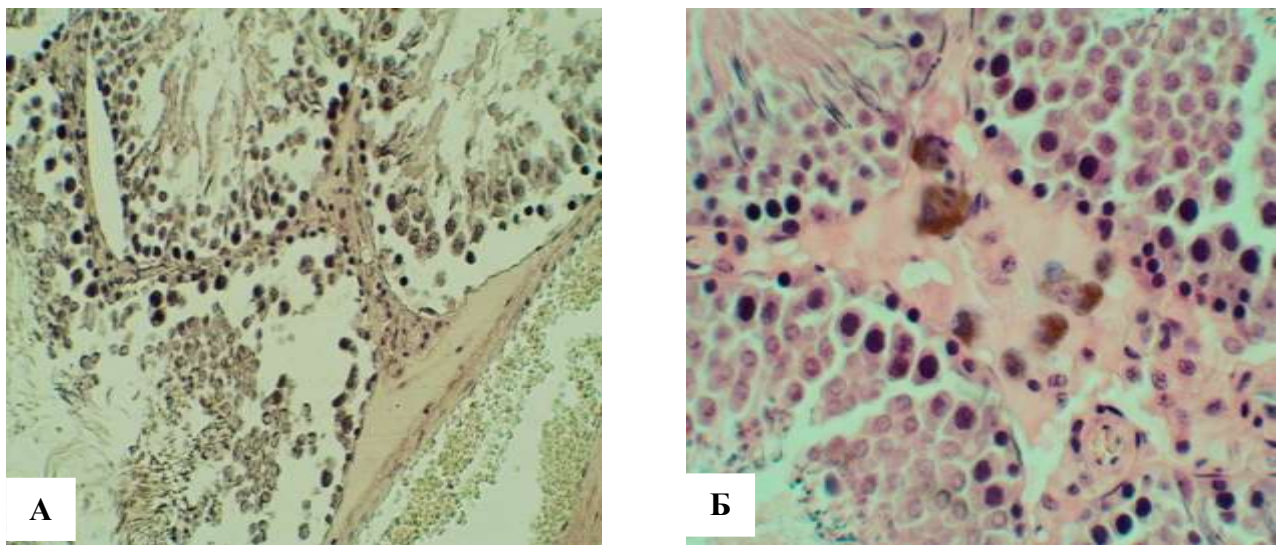


Рисунок 16 – Характеристика стромального компонента животных экспериментальных групп после повторного курса химиотерапии: А – семенники крыс первой экспериментальной группы после повторного курса противоопухолевой терапии на 14-е сутки. Выраженный отек стромы, отслоение сперматогенного эпителия, разрыхления и истончение сперматогенного эпителия. Уменьшение количества клеток Лейдига, сопровождающееся кариопикнозом. Гем и эозин. Ув. $\times 25$; Б – семенник крысы 1-й экспериментальной группы на 14-е сутки. Отек стромы, кариопикноз в клетках Лейдига, десквамация сперматогенного эпителия. Гем и эозин. Ув. $\times 40$

Во второй группе с добавлением антиоксиданта после первого курса химиотерапии так же отмечалось статистически значимое снижение объема

цитоплазмы клеток Лейдига ($P_1 < 0,01$), сопровождающееся уменьшением диаметра ядра эндокриноцитов на 2,57 %. Относительное количество клеток Лейдига снижалось на 11,11 %, что так же нашло отражение в статистически значимом снижении уровня тестостерона на 48,62 %.

После повторного введения препаратов группы СНОР на 14-е сутки у крыс первой экспериментальной группы диаметр ядра уменьшался на 2,09 %, объем клетки – на 19,97 %, что в свою очередь коррелировало со снижением индекса активности эндокриноцитов и приводило к статистически значимому снижению уровня тестостерона на 70,25 %, что было значительно меньшим в сравнении с величиной показателя у крыс группы контроль. Во второй экспериментальной группе после повторного курса полихимиотерапии изменения были следующими: диаметр ядра эндокриноцитов был на 0,32 % больше, чем аналогичный показатель у животных из группы контроля и на 2,41 % больше, чем в группе без добавления антиоксиданта. Объем клеток Лейдига в группах с антиоксидантом так же был несколько больше, чем в группе контроля, разница составила 0,23 %, и на 20,2 % больше, чем в первой экспериментальной группе, относительное количество клеток Лейдига по-прежнему оставалось меньше, чем в группе контроля, разница составила 25 %, что коррелировало с уменьшением индекса активности эндокриноцитов. На фоне резкого снижения уровня тестостерона показатель лютеинизирующего гормона также был снижен на 37,21 %, что свидетельствовало о дистрофических процессах в эндокринном аппарате семенников.

Таблица 6 – Результаты морфометрического исследования клеток Лейдига при применении противоопухолевой химиотерапии (7–14-е сутки) (Me)

Показатели	Группа контроль	Экспериментальные группы в различные периоды наблюдения			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДГК	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДГК
Размер выборки (n)	10	10	10	10	10
Диаметр ядра клетки Лейдига (мкм)	6,21 (6,182 6,285) $P_1 < 0,01$	6,115 (6,082; 6,142) $P_2 < 0,01$;	6,051 (6,011; 6,083) $P_3 < 0,01$;	6,081 (6,035; 6,127) $P_4 < 0,01$;	6,120 (6,085; 6,157) $P_6 < 0,01$;

Продолжение Таблицы 6

Показатели	Группа контроль	Экспериментальные группы в различные периоды наблюдения			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДГК	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДГК
Объем клетки Лейдига (мкм ³)	47,315 (46,905; 48,818) $P_1 < 0,01$	38,349 (31,783; 39,082)	39,687 (37,892; 39,415) $P_3 < 0,01;$	37,685 (31,012; 40,4) $P_4 < 0,01;$	39,142 (37,501; 42,139) $P_5 < 0,01;$ $P_6 < 0,01;$
Относительное количество клеток Лейдига (n)	10,8 (10,4; 11,2) $P_1 < 0,01$	9,1 (8,5; 9,3) $P_2 < 0,01;$	9,6 (9,4; 9,9) $P_3 < 0,01;$	7,9 (7,2; 8,2) $P_4 < 0,01;$	8,1 (7,7; 8,8) $P_5 < 0,01;$ $P_6 < 0,01;$
Индекс активности клеток Лейдига	1,189 (1,171; 1,215) $P_1 < 0,01;$	1,043 (1,015; 1,102)	1,062 (1,022; 1,119) $P_3 < 0,01;$	1,015 (1,012; 1,037) $P_4 < 0,01;$	1,136 (1,113; 1,21) $P_5 < 0,01;$ $P_6 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

В ходе морфофункционального изучения эндокринного аппарата семенников лабораторных крыс установлено, что интенсивность дистрофических и атрофических процессов возрастает пропорционально увеличению концентрации вводимых химиопрепаратов в организме, однозначно свидетельствуя о подавлении гормонсинтезирующей активности клеток Лейдига. Токсический эффект комбинированного химиотерапевтического протокола СНОР сопровождался развитием патоморфологических изменений в интерстициальных структурах семенников, проявляющихся формированием очагов атрофии, сокращением размеров клеточных ядер и общего объема секреторных эндокриноцитов, а также заметным снижением численности функционирующих

клеток уже на седьмые сутки после начала терапии. Эти изменения коррелировали с параллельным понижением концентрации тестостерона и повышением лютеинизирующего гормона в периферической крови экспериментальных животных. Во второй экспериментальной группе применение антиоксиданта дигидрокверцетина позволило существенно уменьшить токсические эффекты химиопрепаратов.

Резюме. Полученные данные свидетельствуют о выраженном угнетающем действии комплекса химиопрепаратов, входящих в протокол СНОР на эндокринную функцию семенников, проявляющемся в виде уменьшения количества клеток Лейдига, снижение доли функционально-активных форм эндокриноцитов, появления признаков клеточной атрофии (включения липофусцина). Применение дигидрокверцетина демонстрирует значительный протекторный потенциал, уменьшая токсические эффекты цитостатиков и способствуя сохранению морфофункциональной целостности эндокринного аппарата семенников.

3.1.4 Иммуноферментный анализ плазмы крови крыс экспериментальных групп

Тестостерон, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны взаимодействуют между собой, образуя сложную сеть обратной связи, контролирующей работу всей репродуктивной системы мужчины. Дисбаланс любого из них может привести к серьезным последствиям, таким как бесплодие, проблемы с потенцией, снижение энергии и настроения, потеря мышечной массы и ослабление иммунитета. Для оценки влияния противоопухолевой терапии на половые гормоны применялся метод иммуноферментного анализа плазмы экспериментальных животных, проводимый на 7-й и 14-й дни эксперимента, с целью количественного определения уровней ФСГ, ЛГ и тестостерона.

Анализ представленных данных демонстрирует, что после первого курса противоопухолевой терапии наблюдалось значительное снижение уровня

тестостерона у особей обеих экспериментальных групп ($p < 0,01$). Первая группа продемонстрировала статистически значимое падение уровня гормона относительно контрольной группы на 52,36 %. Во второй экспериментальной группе также отмечено уменьшение содержания тестостерона — на 48,62 % ($p < 0,01$), что подтверждает эффект подавления синтеза тестостерона цитостатическими препаратами. Отмеченная разница в степени угнетающего воздействия между двумя экспериментальными группами составила 7,26 %.

После повторного курса отмечалось повторное снижение уровня тестостерона. Так в первой экспериментальной группе отмечалось достоверное снижение уровня тестостерона относительно группы контроля на 70,23 %. Во второй экспериментальной группе также отмечено снижение содержания тестостерона — на 65,5 %. Разница между экспериментальными группами увеличилась с 7,26 % до 13,7 %, что позволяет предположить частичное ослабляющее воздействие дигидрокверцетина на механизм подавления секреции тестостерона цитостатиками.

Статистически значимое повышение уровня лютеинизирующего гормона у животных обеих экспериментальных групп свидетельствует о нарушении функции половых желез. Так в первой экспериментальной группе достоверное отличие в сравнение с контролем составило 72,37 % ($p < 0,01$), во второй экспериментальной группе — 72,59 % ($p < 0,01$). На 14-е сутки разница с контроля незначительно снизилась, так в первой экспериментальной группе показатель лютеинизирующего гормона был достоверно выше, чем в группе контроля на 67,14 %, во второй — на 69,55 %.

Одновременно при снижении уровня тестостерона, отмечалось достоверное увеличение уровня фолликулостимулирующего гормона у животных обеих экспериментальных групп. Так разница между первой экспериментальной группой и контролем на 7-е сутки составила 71,85 %, между второй экспериментальной группой и контролем — 65,36 %. Разница между экспериментальными группами составила 19,48 % (Таблица 7).

Резюме. Иммуноферментный анализ содержания половых гормонов свидетельствует о нарушении в системе гипофизарно-гонадной регуляции после

двукратного применения комплекса химиопрепаратов, входящих в протокол СНОР. Полученные данные демонстрируют выраженное угнетение андрогенной функции: достоверное снижение уровня тестостерона ($p < 0,01$), компенсаторную реакцию гипофиза: повышение достоверное повышение концентрации лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов ($p < 0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о глубоком дисбалансе гормональной регуляции репродуктивной системы при химиотерапии, проявляющемся в угнетении тестикулярной функции и компенсаторной активации гипофизарного звена. Применение антиоксиданта частично нивелировало токсическое действие комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР.

Таблица 7 – Динамические изменения уровня половых гормонов животных контрольной и экспериментальных групп (7–14-е сутки) (Ме)

Параметры	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		СНОР 7-е сут.	ДГК 7-е сут.	СНОР 14-е сут.	ДГК 14-е сут.
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
ФСГ (МЕ/л)	1,43 (0,98; 2,21) $P_1 < 0,01$;	5,08 (4,04; 6,69)	4,09 (2,99; 5,29)	6,51 (5,16; 8,21)	5,45 (4,43; 6,67)
ЛГ (МЕ/л)	4,61 (3,35; 5,81) $P_1 < 0,01$;	16,69 (15,46; 17,93)	16,82 (15,73; 18,63) $P_3 < 0,01$;	14,03 (12,04; 16,08) $P_4 < 0,01$;	15,14 (14,135; 16,080) $P_6 < 0,01$;
Тестостерон (нмоль/л)	9,116 (8,146; 9,801) $P_{1M} 0,01$;	4,340 (4,192; 4,344)	4,683 (4,311; 4,794) $P_3 < 0,01$;	2,714 (2,385; 2,942) $P_4 < 0,01$;	3,145 (2,881; 3,422) $P_6 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

3.1.5 Цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс экспериментальных групп

Согласно результатам исследования, общее количество сперматозоидов в эпидидимальной суспензии у крыс первой экспериментальной группы на седьмые сутки составило 110,21 млн в 1 мл, что на 42 % меньше, чем в группе контроля (190,21 млн в 1 мл) ($< 0,01$). У крыс из второй экспериментальной группы с применением антиоксиданта общее количество сперматозоидов было незначительно ниже, чем в первой группе и разница с группой контроля составила 42,25 % ($< 0,01$). При этом отмечалось резкое увеличение количества патологических форм сперматозоидов в обеих экспериментальных группах, что могло указывать на повреждающее действие препаратов (Рисунок 17). Так 47,13 млн в 1 мл в первой экспериментальной группе, что на 112,29 % выше, чем в группе контроля (22,2 млн в 1 мл) ($< 0,01$), в группе с добавлением антиоксиданта – 42,51 млн в 1 мл, что на 91,48 % выше чем аналогичный показатель в группе контроля ($< 0,01$). После повторного курса химиотерапии на 14-е сутки в первой экспериментальной группе разница с группой контроля составила 45,71 % ($< 0,01$) и на 6,32 % меньше, чем во второй экспериментальной группе, а во второй экспериментальной группе отмечалось незначительное увеличение общего количества сперматозоидов в 1 мл, и разница с группой контроля составила 42,05 % ($< 0,01$).

Подтверждением явилось снижение в эпидидимальной суспензии у крыс экспериментальных групп содержания фертильных форм сперматозоидов относительно группы контроля (Таблица 8). Дальнейшие исследования показали, что после первого курса противоопухолевой терапии на 7-е сутки общее количество фертильных мужских половых клеток в экспериментальных группах было снижено относительно группы контроля на 77,61 % в первой экспериментальной группе и на 70,09 % во второй экспериментальной группе.

В группе с применением природного биофлавоноида фертильных мужских половых клеток было на 20,49 % больше, чем в первой экспериментальной группе.

На 14-е сутки разница в количестве фертильных форм между экспериментальными группами резко увеличилась с 20,49 % до 45,11 %, что могло свидетельствовать о протективной функции антиоксиданта в отношении фертильности мужских половых клеток от цитотоксического действия препаратов входящих в схему СНОР. В первой экспериментальной группе после повторного введения комплекса препаратов отмечалось снижение на 14,81 % фертильных форм сперматозоидов в сравнении с 7-ми сутками, в то время как во второй экспериментальной группе отмечалось увеличение фертильных форм сперматозоидов на 18,96 % в сравнении с 7-ми сутками. Таким образом, разница между первой и второй группой на 14-е сутки составила 45,17 % ($P < 0,01$).

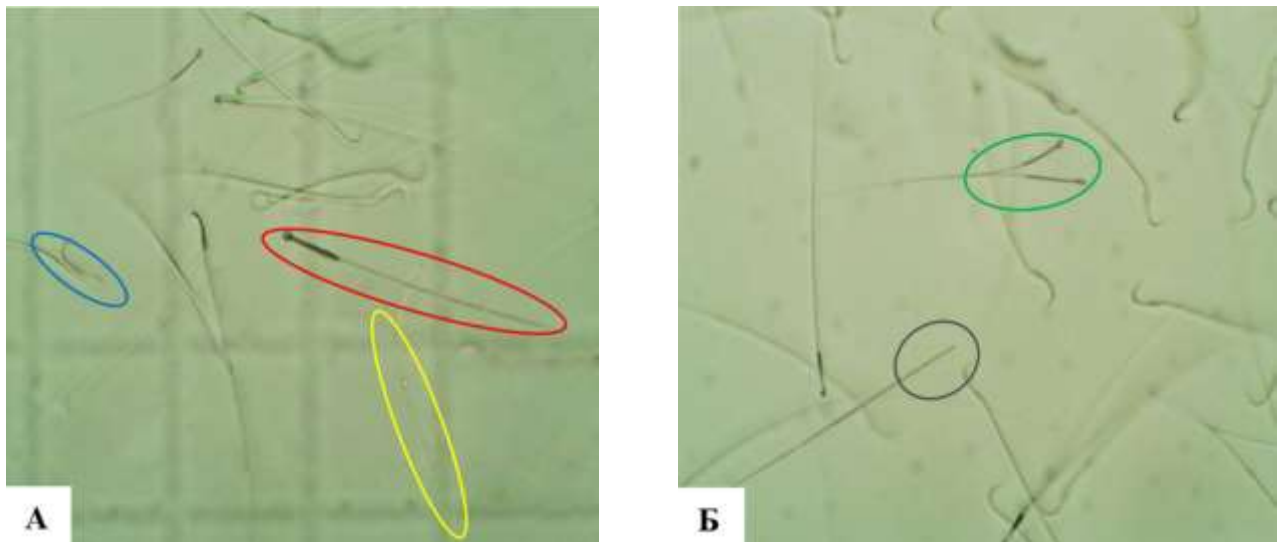


Рисунок 17 – Патологические формы сперматозоидов: А – эпидидимальные сперматозоиды крыс 1-ой экспериментальной группы 14-е сутки: красным цветом выделен дефект хвостового отдела (укороченный хвост), желтым – цитоплазматическая капля в хвостовом отделе, синим – удвоение хвоста, дефект тела; Б – эпидидимальные сперматозоиды крыс 1-ой экспериментальной группы 14-е сутки: зеленым цветом выделено удвоение головки, черным – дефект головки (отсутствие головки)

Аналогичные изменения можно было увидеть в фракциях прогрессивно-подвижных и малоподвижных сперматозоидов. В первой экспериментальной группе на 14-е сутки отмечалось уменьшение количества подвижных форм сперматозоидов на 20,59 %, во второй группе отмечалось увеличение на 18,18 %, разница между первой и второй группами на 14-е сутки составила 56,48 % ($P < 0,01$)

Обратная закономерность наблюдалась во фракции не фертильных форм сперматозоидов. Наибольшее количество сперматозоидов данной фракции наблюдалось в первой экспериментальной группе как на 7-е, так и на 14-е сутки. Таким образом количество не фертильных сперматозоидов на 7-е сутки составило 75,97 млн в 1 мл, что на 39,33 % выше, чем аналогичный показатель в группе контроля, и на 36,85 % выше, чем в группе с добавлением антиоксиданта. Так же стоит отметить, что разница между группой контроля и 2-й экспериментальной группой составила 3,91 %.

На 14-е сутки была аналогичная картина: во второй экспериментальной группе показатель не фертильных форм сперматозоидов был на 23,13 % выше ($P < 0,01$), чем в группе контроля, и на 23 % ниже ($P < 0,01$), чем в первой экспериментальной группе.

В фракции дергающихся форм сперматозоидов не отмечалось достоверного различия в группах контроля и экспериментальных группах.

Во фракции неподвижных форм сперматозоидов отмечалось значимое увеличение половых клеток в первой экспериментальной группе как на 7-е, так и на 14-е сутки. Таким образом, на 7-е сутки показатель неподвижных клеток был на 77,39 % выше, чем в группе контроля, и на 60,44 % выше, чем в группе с добавлением антиоксиданта дигидрокверцетина. На 14-е сутки наиболее высокий показатель неподвижных форм сперматозоидов был в первой экспериментальной группе, а именно на 75,2 % выше, чем в группе контроля, и на 44,71 % выше, чем во второй экспериментальной группе. Динамические исследования двигательной активности сперматозоидов у крыс экспериментальных групп и группы контроля представлены на Рисунках 16, 1, 18, 19, 20 и 21. Выявленные изменения

двигательной активности сперматозоидов представляют собой данные, полученные при подсчёте клеток в эпидидимальной суспензии в первую минуту наблюдения. О жизнеспособности сперматозоидов судили по характеру изменений их двигательной активности на 15-й, 30-й, 45-й, 60-й, 90-й, 120-й, 150-й и 180-й минутах наблюдения.

На 7-е сутки с 1-й по 15-ю минуты наблюдения отмечалось значимое снижение прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов в обеих экспериментальных группах, разница между первой экспериментальной группой и группой контроля составила 33,2 %, между второй экспериментальной группой и группой контроля – 24,12 %. На всех временных отрезках значение прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов в группе с добавлением антиоксиданта было выше, чем в первой экспериментальной группе. У крыс из группы контроля прогрессивно-подвижные сперматозоиды сохранялись вплоть до 90-й минуты в то время, как в первой экспериментальной группе аналогичные значения (2,1 %) достигали уже на 45-й минуте, во второй экспериментальной группе на 60-й минуте отмечался показатель 4,35 % (Рисунок 18).

Во фракции слабоподвижных сперматозоидов на 7-е сутки с первой минуты также отмечалось значимое снижение сперматозоидов. На 15-й минуте наблюдалось пиковое увеличение количества слабоподвижных сперматозоидов во всех группах. Однако, разница между группой контроля и первой экспериментальной группой составила 12,21 %, между второй экспериментальной группой и группой контроля разница составила 7,29 %. Разница между экспериментальными группами составила 4,92 %. В группе контроля показатель слабоподвижных сперматозоидов приближался к отметке 0 на 120-й минуте, в то время как в первой экспериментальной группе значение, близкое к 0, наблюдалась на 60-й минуте, в группе с добавлением антиоксиданта дигидрохверцетина – на 90-й минуте.

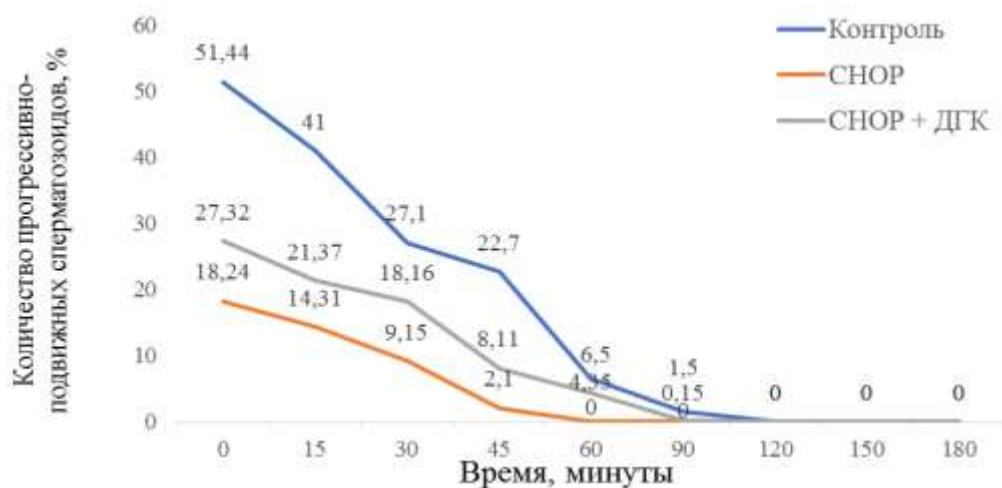
Динамические изменения во фракции «дергающихся» сперматозоидов были следующими: наибольший процент на временных промежутках 0–60 минут, приходится на вторую экспериментальную группу. С 45-й минуты было резкое

снижение сперматозоидов данной фракции и переход их во фракцию неподвижных. В группе с применением антиоксиданта также отмечалось количество «дергающихся» сперматозоидов выше, чем в группе контроль. Снижение «дергающихся» сперматозоидов на 45-ю минуту происходило во всех группах, однако в первой экспериментальной группе разница между 45-й и 60-й минутой составила 41,11 %, во второй экспериментальной группе – 23,25 %, в группе контроля – 5,72 %.

К 120-й минуте исследования в группе контроля показатель неподвижных сперматозоидов равен 97,88 %, в экспериментальных группах показатель неподвижных сперматозоидов равен 97,61 % в первой группе и 94,93 % во второй группе уже к 90-й минуте (Рисунок 19).

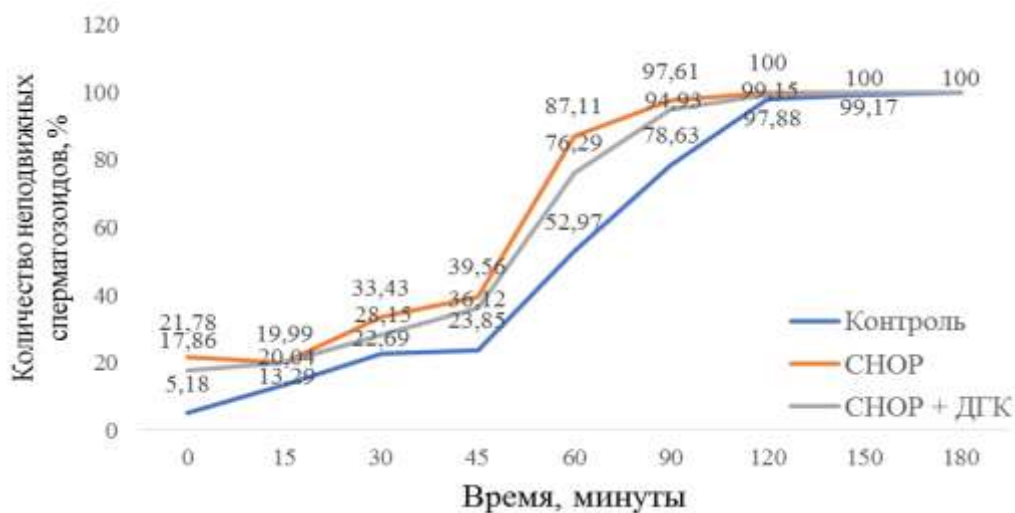
Динамические изменения различных форм сперматозоидов напрямую отражают индекс фертильности животных экспериментальных групп и группы контроля (Рисунок 20). Как видно из графика на всех сроках исследования наименьший показатель индекса фертильности в первой экспериментальной группе. Показатель индекса фертильности к первой минуте во второй экспериментальной группе в 1,46 раза выше, чем в первой, однако ниже в 4,69 раза, чем в группе контроля.

На 14-е сутки после повторного курса химиотерапии отмечались изменения аналогичные 7-м суткам. Наименьшее количество прогрессивно-подвижных и малоподвижных форм сперматозоидов на всех временных промежутках отмечалось в группе с применением комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР (Рисунки 18, 19, 20, 21, 22 и 23).



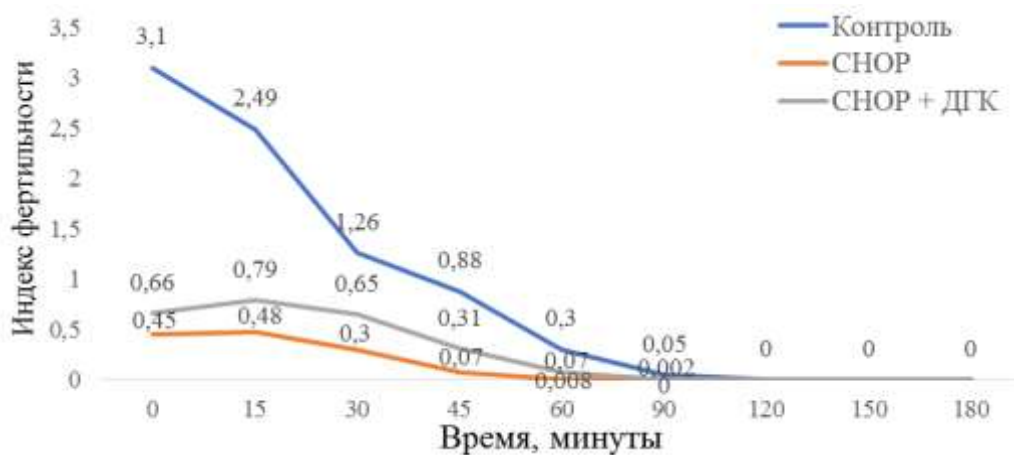
Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – количество «дергающихся» сперматозоидов, выраженное в % (0–60).

Рисунок 18 – Динамика содержания прогрессивно-подвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 7-е сутки



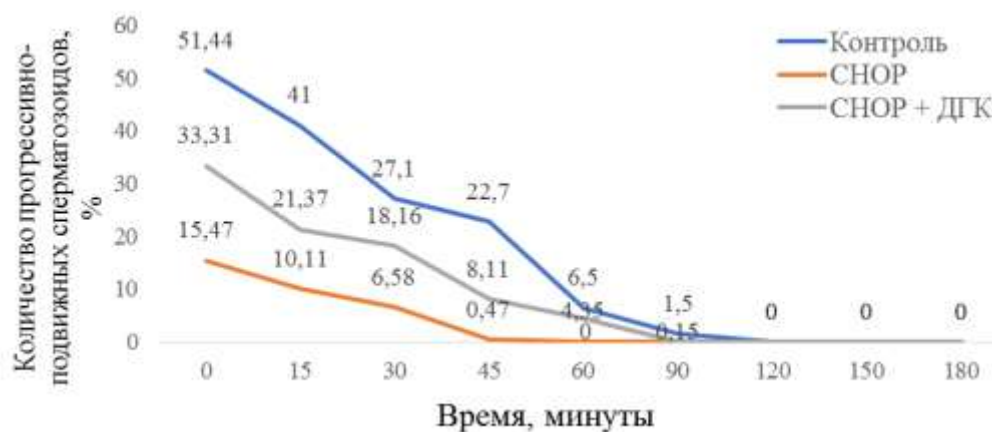
Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – количество «неподвижных» сперматозоидов, выраженное в % (0–100).

Рисунок 19 – Динамика содержания неподвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 7-е сутки



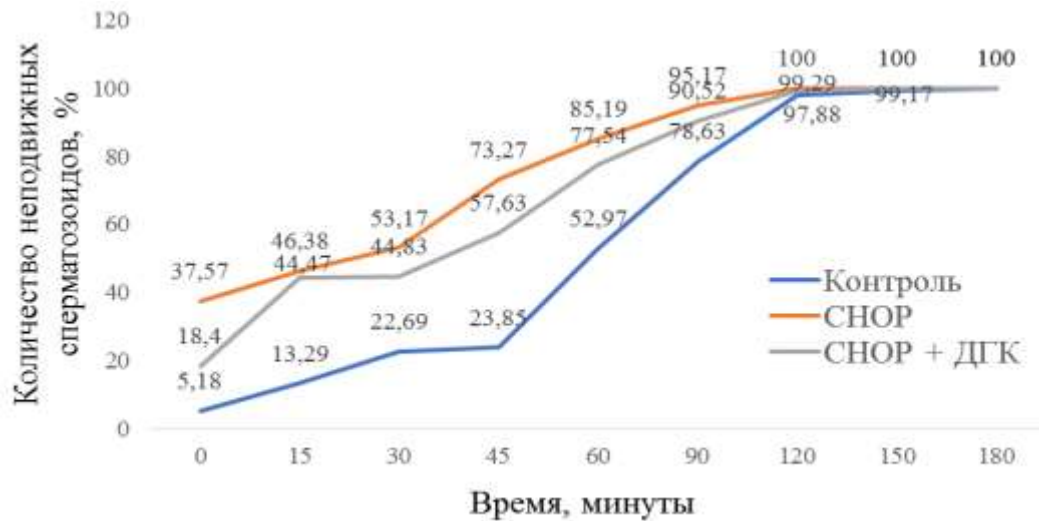
Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – индекс фертильности.

Рисунок 20 – Динамика изменения индекса фертильности животных контрольной и экспериментальных групп на 7-е сутки



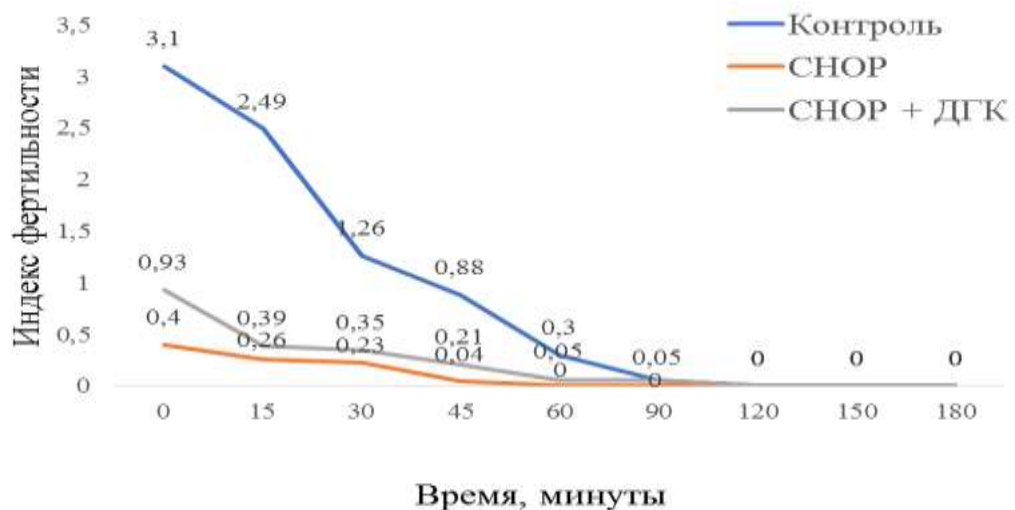
Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – количество прогрессивно подвижных сперматозоидов, выраженное в % (0–60).

Рисунок 21 – Динамика содержания прогрессивно подвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 14-е сутки



Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – количество «неподвижных» сперматозоидов, выраженное в % (0–100).

Рисунок 22 – Динамика содержания неподвижных сперматозоидов в эpidидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 14-е сутки



Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – количество «неподвижных» сперматозоидов, выраженное в % (0–100).

Рисунок 23 – Динамика изменения индекса фертильности животных контрольной и экспериментальных групп на 14-е сутки

Резюме. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о цитотоксическом действии химиотерапии на мужские половые клетки, выражающемся в снижении количества, фертильности и подвижности сперматозоидов, а также в росте патологических форм. Включение антиоксиданта в схему лечения нивелировало токсическое действие цитостатиков на сперматогенез, что подтверждается более высокими показателями фертильности и двигательной активности сперматозоидов во второй экспериментальной группе.

Таблица 8 – Динамическое изменение сперматозоидов животных контрольной и экспериментальных групп в зависимости от сроков проведения исследования (7–14-е сутки)

Показатели	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДКГ	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДКГ
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Общее количество сперматозоидов (n)	190,01 (186,17; 194,21) $P_1 < 0,01$;	110,21 (107,32; 115,41)	109,83 (105,11; 112,46) $P_3 < 0,01$;	103,15 (97,11; 107,34) $P_4 < 0,01$;	110,11 (108,17; 113,51) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;
Фертильные формы сперматозоидов (n)	144,01 (140,07; 147,18) $P_1 < 0,01$;	34,244 (32,17; 37,63) $P_2 < 0,01$;	43,07 (40,58; 45,12) $P_3 < 0,01$;	29,17 (27,15; 31,41) $P_4 < 0,01$;	53,15 (49,42; 55,61) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;
%	75,65 (75,23; 75,78)	31,07 (29,97; 32,61)	39,21 (38,61; 40,12)	28,79 (27,95; 29,26)	48,27 (45,68; 48,99)
Прогрессивно-подвижные формы сперматозоидов (n), %	97,92 (93,17; 101,67) $P_1 < 0,01$;	20,10 (19,12; 22,11) $P_2 < 0,01$;	30,01 (28,17; 33,49) $P_3 < 0,01$;	15,96 (14,13; 16,75) $P_4 < 0,01$;	36,68 (33,17; 38,21) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;
%	51,44 (50,04; 52,35)	18,24 (17,21; 19,15)	27,32 (26,81; 29,77)	15,47 (14,72; 15,61)	33,31 (30,66; 33,66)
Малоподвижные формы сперматозоидов (n), %	46,08 (45,51; 49,9) $P_1 < 0,01$;	14,14 (12,07; 15,19) $P_2 < 0,01$;	13,79 (10,15; 15,03) $P_3 < 0,01$;	13,21 (12,11; 14,03) $P_4 < 0,01$;	16,47 (15,13; 17,64) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;
%	24,21 (23,43; 25,19)	12,83 (11,24; 13,16)	12,55 (9,65; 13,36)	12,81 (12,47; 13,07)	14,96 (13,98; 15,54)
Не фертильные формы сперматозоидов (n)	46,09 (45,58; 46,91) $P_1 < 0,01$;	75,97 (74,17; 77,06) $P_2 < 0,01$;	47,97 (45,13; 50,64) $P_3 < 0,01$;	73,98 (69,96; 75,93) $P_4 < 0,01$;	56,96 (54,27; 59,85) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;
%	24,21 (23,43; 25,19)	68,93 (67,39; 70,03)	43,67 (42,93; 45,02)	71,65 (70,37; 72,04)	51,73 (50,17; 52,76)
Дергающиеся (n)	36,49 (35,17; 38,27) $P_1 < 0,01$;	33,45 (32,11; 35,53) $P_2 < 0,01$;	31,14 (28,83; 32,78) $P_3 < 0,01$;	35,22 (31,13; 37,31) $P_4 < 0,01$;	35,53 (33,43; 38,57) $P_5 < 0,01$;
%	19,17 (18,89; 19,69)	30,35 (29,91; 30,78)	28,35 (27,42; 29,14)	34,14 (32,05; 34,75)	32,27 (30,91; 33,97)

Продолжение Таблицы 8

Показатели	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		7-е сутки СНОР	7-е сутки СНОР + ДГК	14-е сутки СНОР	14-е сутки СНОР + ДГК
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Неподвижные (n) %	9,61 (7,92; 10,34)	42,52 (40,71; 45,16)	16,82 (14,93; 19,12)	38,76 (36,15; 41,19)	21,43 (19,75; 22,87)
	P ₁ < 0,01; 5,11 (5,07; 5,33)	P ₂ < 0,01; 38,58 (37,93; 39,13)	P ₃ < 0,01; 15,31 (14,21; 17,01)	P ₄ < 0,01; 37,57 (37,22; 38,73)	P ₅ < 0,01; P ₆ < 0,01; 18,40 (18,25; 20,14)
Примечание: P ₁ – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P ₂ – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P ₃ – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P ₄ – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P ₅ – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P ₆ – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

3.2 Морфофункциональное состояние семенников крыс после проведения химиотерапии на 21–35-е сутки

3.2.1 Морфологическая характеристика семенников крыс экспериментальных групп

Одним из важных критериев, затрагивающих компенсаторно-приспособительные процессы в экспериментальной модели мужского бесплодия, вызванного применением комплекса противоопухолевых препаратов, являлся после курсовой период, а именно 21–35 сутки исследования.

Согласно данным Гелашвили О. А., 1-й день жизни крысы равен 52 двум дням жизни человека. В перерасчете на человеческую модель 21-е сутки равны 3 годам после курсового периода и 35-е сутки равны 5 годам [1].

На 21-е сутки отмечалось восстановление показателей массы животных, массы семенников и гонадосоматического индекса, однако оставались ниже, чем показатели контрольной группы. Так в первой экспериментальной группе масса животных был на 4,12 % меньше, чем в группе контроль, масса семенников на 7,47 % ниже. В группе с добавлением дигидрокверцетина показатели были ниже на 2,79% и 5,74% ниже, чем в группе контроль. За указанный промежуток времени в группах с добавлением антиоксиданта исследуемые показатели выше, чем в первой экспериментальной группе. Аналогичные изменения сохраняются и на 35-е сутки, а именно в третьей экспериментальной группе показатели массы животных и массы семенников остаются ниже, чем у животных контрольной группы: на 3,07 % и 6,89 % соответственно. В группе с применением антиоксиданта показатель массы животных приближается к показателю группы контроль, разница в среднем составила 0,29 %, однако показатель массы семенников по-прежнему меньше, чем в группе контроля, разница составила 4,59 %. Результаты морфометрии представлены в Таблице 9. Значение объема семенников животных экспериментальных групп также были снижены.

Семенники животных экспериментальных групп были уменьшены, более плотные, суховатые, бледно-серого цвета на разрезе, малокровны.

Таблица 9 – Динамические изменения макроскопических параметров семенников животных контрольной и экспериментальных групп, после перенесенной химиотерапии (21–35-е сутки) (Me)

Показатель	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальной группы			
		21-е сутки СНОР	21-е сутки СНОР + ДГК	35-е сутки СНОР	35-е сутки СНОР + ДГК
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
$m_{ж}, г.$	286 (284,25; 297,25) $P_1 < 0,01;$	274,5 (271,25; 275,75) $P_2 < 0,01;$	278 (275,75; 283,5) $P_3 < 0,01;$	277 (275,25; 281,75) $P_4 < 0,01;$	282,5 (276,75; 285,75) $P_5 < 0,01;$
$m_c, г.$	1,73 (1,70; 1,76) $P_1 < 0,01;$	1,61 (1,58; 1,63) $P_2 < 0,01;$	1,64 (1,63; 1,66) $P_3 < 0,01;$	1,62 (1,58; 1,65) $P_4 < 0,01;$	1,66 (1,63; 1,69) $P_5 < 0,01;$
Весовой индекс, %	0,604 (0,593; 0,623)	0,590 (0,584; 0,593)	0,589 (0,588; 0,593)	0,577 (0,574; 0,585)	0,588 (0,587; 0,590)
$V, мм^3$	2 178 (1 296; 3 276)	1 562 (1 247; 2 165)	1 769 (1 137; 2 217)	1 814 (1 252; 2 189)	1 876 (1 360; 2 280)
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 21-е сутки СНОР и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 35-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 35-е сутки СНОР и 35-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 35-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

При гистологическом исследовании во всех экспериментальных группах количество капилляров в поле зрения оставалось равным контролю. Наибольшие изменения в сосудистой стенке приходилось на 21-е сутки, характеризовались утолщением и огрублением волокон с исходом в гиалиноз, накоплением кислых гликозаминогликанов, обладающих низкой биологической активностью и

усиливающих процессы склерозирования за счет образования стабильных волокнистых структур.

С 21-х суток отмечается изменение в стромально-паренхиматозном соотношении, за счет увеличения площади паренхимы, однако стромально-паренхиматозный коэффициент по-прежнему остается ниже, чем в группе контроля (Таблица 10).

Таблица 10 – Динамические изменения стромально-паренхиматозного соотношения животных контрольной и экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме)

Показатель	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		21-е сутки СНОР	21-е сутки СНОР + ДГК	35-е сутки СНОР	35-е сутки СНОР + ДГК
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Площадь паренхимы					
Абс. П ($\times 10^4$ мкм ²)	53 (50; 54)	49,8 (48,7; 51,3)	49,8 (47; 53)	50,2 (46; 49)	51,2 (48; 50)
%	87,1 (86,6; 89,1)	84,2 (83,8; 84,7) $P_1 < 0,01$;	86,2 (85,7; 86,4) $P_2 < 0,01$;	84,9 (82,8; 83,3) $P_3 < 0,01$;	86,3 (84,7; 86,4) $P_4 < 0,01$;
Площадь стромы					
Абс. С ($\times 10^4$ мкм ²)	7,9 (6,1; 8,3)	9,3 (8,7; 9,5) $P_1 < 0,01$	7,9 (7,8; 8,3)	8,9 (9,5; 9,8) $P_3 < 0,01$	8,1 (7,8; 8,8) $P_4 < 0,01$
%	12,9 (10,8; 13,3)	15,8 (13,8; 14,4) $P_1 < 0,01$	13,8 (13,5; 14,2) $P_2 < 0,01$	15,1 (16,7; 17,2) $P_3 < 0,01$	13,7 (13,4; 15,2) $P_4 < 0,01$
К	6,7 (6,5; 8,1)	6,02 (5,9; 6,2) $P_1 < 0,01$	6,2 (6,0; 6,3) $P_2 < 0,01$	4,8 (4,8; 5,0) $P_3 < 0,01$	6,1 (5,6; 6,1) $P_4 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 35-е сутки СНОР; P_4 – достоверность различий между группой контроля и 35-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

Резюме. Проведенное исследование показало, что к 21-м и 35-м суткам после воздействия химиотерапии у животных экспериментальных групп наблюдалось неполное восстановление репродуктивных показателей по

сравнению с контрольной группой. Масса тела и семенников оставалась сниженной в обеих экспериментальных группах, однако в группе с применением дигидрокверцетина эти показатели были ближе к контрольным значениям (разница в массе тела всего 0,29 % к 35-м суткам), что свидетельствует о протективном эффекте антиоксиданта. Семенники животных экспериментальных групп отличались меньшим объемом, повышенной плотностью, бледной окраской и сниженной васкуляризацией, что указывает на длительные структурные изменения после химиотерапевтического воздействия. При микроскопическом исследовании выявлены склеротические процессы в сосудистой стенке, накопление кислых гликозаминогликанов и нарушение стромально-паренхиматозного соотношения, что может негативно влиять на сперматогенез.

Несмотря на тенденцию к восстановлению, полной нормализации морфофункциональных параметров семенников к 35-м суткам не происходило. Применение дигидрокверцетина способствовало более быстрому и выраженному восстановлению, что подтверждает его протективную роль в отношении репродуктивной системы при химиотерапии.

3.2.2 Морфометрическая характеристика и иммуногистохимическое исследование сперматогенного эпителия крыс экспериментальных групп

Как на 21-м сутки, так и на 35 сутки во всех экспериментальных группах сохраняются нарушения гематотестикулярного барьера, сопровождающиеся дистрофическими изменениями в сперматогенном эпителии (Рисунок 24). Однако стоит отметить, что дистрофические процессы выражены в меньшей степени, чем на 14-е сутки.

Значение среднего размера строго поперечного сечения семенного канальца и его площадь у крыс из группы с добавлением антиоксиданта на 21–35-е сутки оставалось достоверно ниже, чем в группе контроля, но было выше, чем в группе с применением противоопухолевых терапии (Таблица 11).

Таблица 11 – Динамические изменения толщины сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме)

Показатель	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		21-е сутки СНОР	21-е сутки СНОР + ДГК	35-е сутки СНОР	35-е сутки СНОР + ДГК
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Толщина сперматогенного эпителия, мкм	32,26 (27,37; 38,35) $P_1 < 0,01$	12,33 (10,53; 13,46) $P_2 < 0,01$	18,0 (15,93; 21,06) $P_3 < 0,01$	16,03 (14,82; 19,62) $P_4 < 0,01$	20,76 (18,84; 24,23) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$
Толщина стенки канальца, мкм	2,77 (2,44; 3,24) $P_1 < 0,01$	7,93 (6,38; 8,68)	7,68 (5,89; 8,97) $P_3 < 0,01$	6,89 (5,80; 7,73) $P_4 < 0,01$	6,70 (5,19; 8,07) $P_6 < 0,01$
D_K , мкм	122,73 (113,98; 156,14) $P_1 < 0,01$	95,55 (89,69; 112,62) $P_2 < 0,01$	105,64 (94,53; 118,63) $P_3 < 0,01$	104,34 (93,09; 120,39) $P_4 < 0,01$	109,61 (102,24; 116,49) $P_6 < 0,01$
S_K , мкм ²	11 828,61 (10 203,03; 18 499,63) $P_1 < 0,01$	7 416,09 (6 530,25; 11 144,46) $P_2 < 0,01$	8 308,61 (6 187,86; 11 050,70) $P_3 < 0,0$	8 547,08 (6 803,18; 11 428,58) $P_4 < 0,01$	9 462,79 (8 206,39; 10 653,13) $P_6 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 35-е сутки СНОР; P_4 – достоверность различий между группой контроля и 35-е сутки СНОР + ДГК; D_K – внутренний диаметр семенного канальца; S_K – площадь семенного канальца; n – число наблюдений.					

На 21-е сутки отмечается тенденция к увеличению толщины сперматогенного эпителия: в первой группе между 14-ми и 21-ми сутками составила 6,39 %, во второй группе – 7,59 %. Стоит отметить, что разница между показателями толщины сперматогенного эпителия первой и второй экспериментальной групп на 21-е сутки составила 17,66 %. Несмотря на увеличение толщины сперматогенного эпителия, сохранялись канальцы, в которых наблюдалось уменьшение количества всех форм зародышевых клеток,

кроме того, в семенниках крыс первой экспериментальной сохранялись каналцы с синдромом клеток Сертоли. При исследовании сперматогенного эпителия на 35-е сутки у животных первой экспериментальной группы разница между показателями толщины сперматогенного эпителия на 21-е и 35-е сутки составила 11,47 %, во второй группе – 8,55 %. Разница между первой и второй группой на 35-е сутки составила 14,66 %, что говорит о протективном действии антиоксиданта дигидрокверцетина в отношении сперматогенных клеток при применении противоопухолевой терапии (Рисунок 31). Однако, несмотря на положительное влияние антиоксиданта, разница с группой контроля составила 35,65 %. На 35-е сутки в обеих экспериментальных группах сохранялась тенденция к увеличению количества зародышевых клеток.

Увеличение толщины сперматогенного эпителия напрямую связано с увеличением количества сперматогенных клеток (Таблица 12). Однако стоит отметить, что несмотря на увеличение количества сперматогенных клеток, как на 21-е сутки, так и на 35-е сутки в обеих экспериментальных группах наблюдалось значительное количество клеток, подвергшихся дистрофическим изменениям (вакуолярная дистрофия, зернистое набухание цитоплазмы).

Сперматогенный эпителий оставался разрыхленным, половые клетки пролежали друг к другу не плотно, между клетками наблюдались промежутки, с четкими границами между клетками, в ряде каналцев отмечались единичные сперматозоиды.

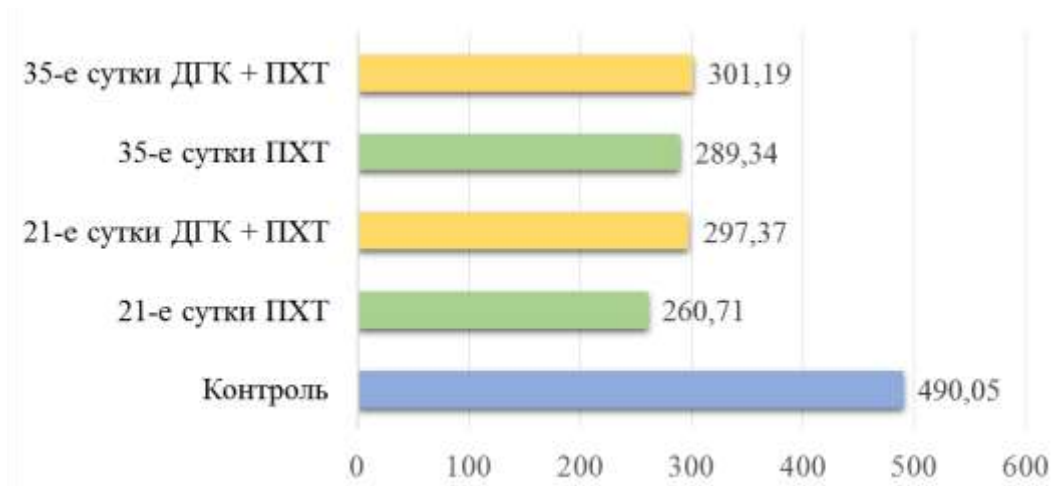


Рисунок 24 – Динамические изменения среднего количества сперматогенных клеток в канальце исследуемых животных (21–35-е сутки)

Как видно из Таблицы 12 процентное содержание сперматогоний в экспериментальных группах как на 21-е, так и на 35-е сутки выше, чем в группе контроля. Наибольший процент сперматогоний приходится на 21-е сутки в первой экспериментальной группе, разница с группой контроля составила 6,01 %. В наблюдаемых сперматогониях обнаруживались вакуоли округлой формы и различного размера. В количественном соотношении количество сперматогоний было снижено относительно группы контроля в 1,21 раза и в 1,04 раза в сравнении с второй экспериментальной группой (Рисунок 25).

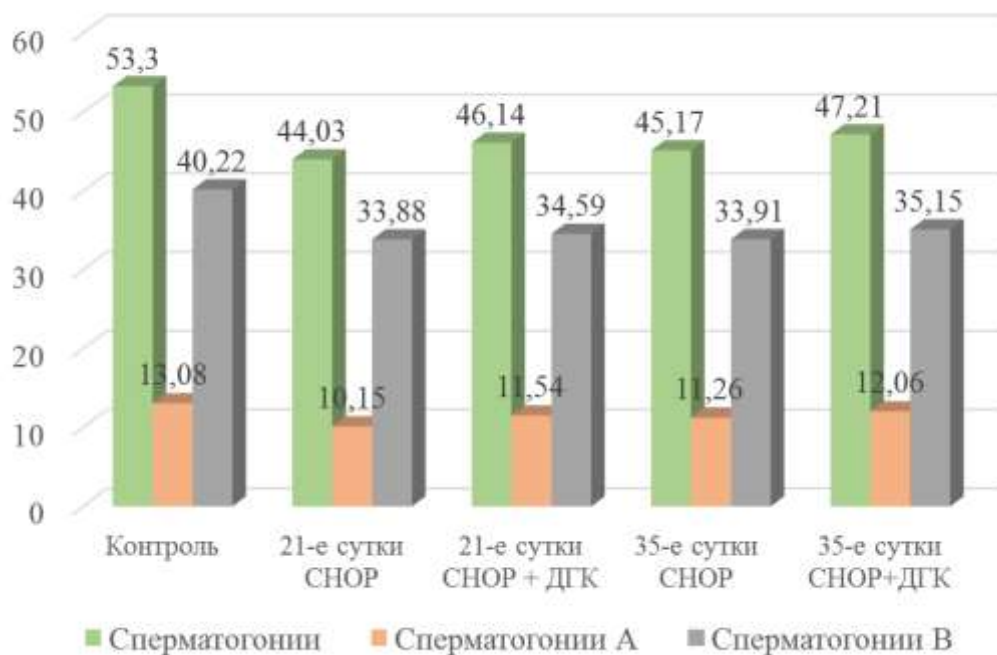


Рисунок 25 – Динамические изменения среднего количества сперматогенных клеток в канальце исследуемых животных (21–35-е сутки)

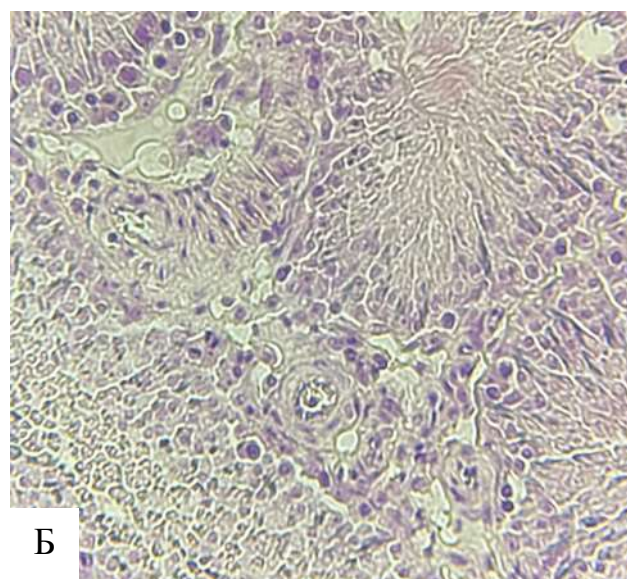
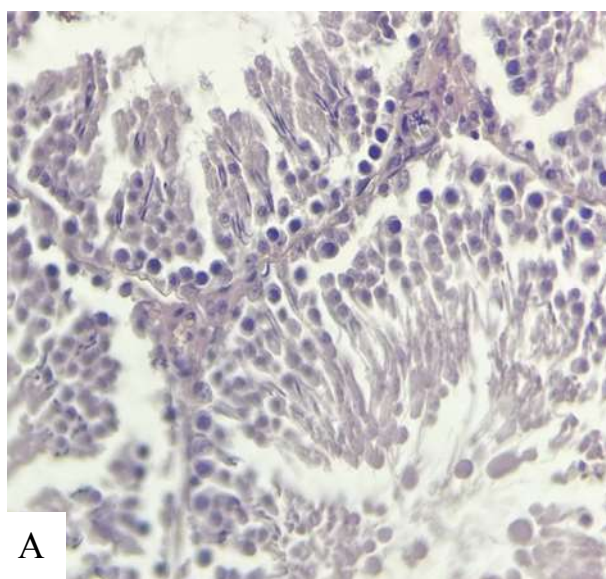


Рисунок 26 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп на 21-е сутки исследования: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы 21-е сутки: десквамация клеток сперматогенного эпителия. Гем. Эозин. Ув. $\times 40$; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы: восстановление сперматогенного эпителия, вакуоль в толще сперматогенного эпителия, склероз стенок артериол, отек стромы. Гем. Эозин. Ув. $\times 25$

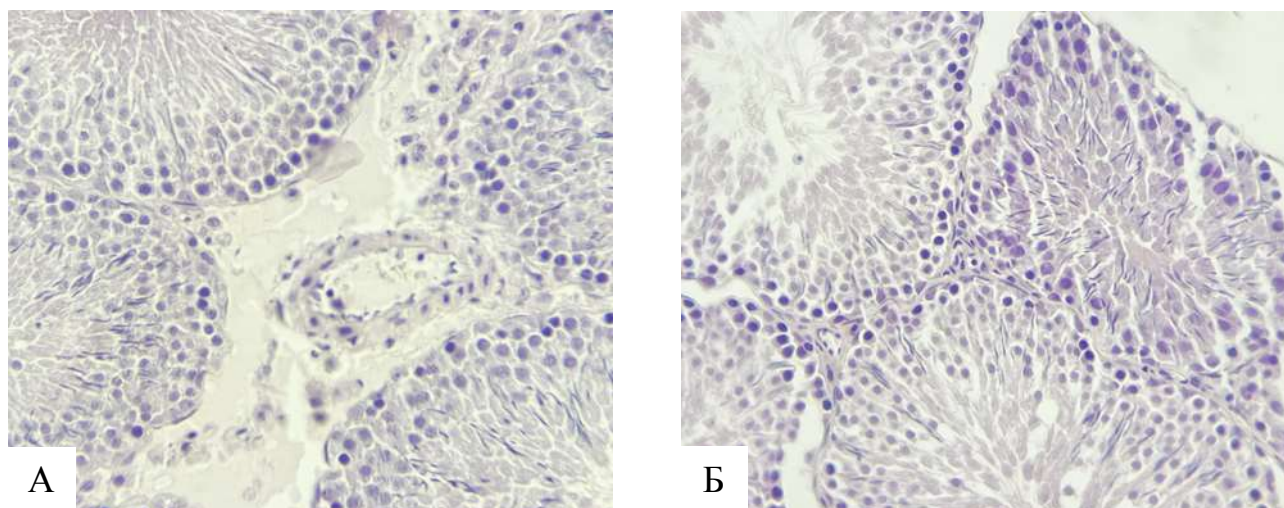


Рисунок 27 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп на 35-е сутки исследования: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы 35-е сутки: восстановление сперматогенного эпителия, утолщение стенки артериолы, массивный отек стромы; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы 35-е сутки: восстановление сперматогенного эпителия, вакуоль в толще сперматогенного эпителия, сохранение пространств между клетками сперматогенного эпителия. Гем. Эозин. Ув. $\times 40$

На 21-е сутки наблюдалось увеличение количества сперматозоидов в сравнении с 14-ми сутками, но показатель был по-прежнему ниже, чем в группе контроля. Так в первой экспериментальной группе показатель на 21-е сутки был на 9,47 % выше, чем аналогичный показатель на 14-е сутки, но на 36,57 % ниже, чем в группе контроля. Во второй экспериментальной группе на 21-е сутки показатель сперматозоидов на 21,68 % выше, чем на 14-е сутки, но остается ниже, чем в группе контроля на 20,29 %. Также следует отметить, что разница в количестве сперматозоидов между первой и второй экспериментальными группами составила 20,42 %. На 35-е сутки тенденция к увеличению сперматозоидов сохранилась в обеих экспериментальных группах, так в первой группе количество клеток выросло на 13,38 %, во второй экспериментальной группе увеличение сперматозоидов было незначительным и составило 0,54 %. Разница между первой и второй экспериментальными группами составила 8,63 % (Рисунок 28).

В ходе изучения сперматид на 21-е сутки было выявлено их увеличение в обеих экспериментальных группах. В первой экспериментальной группе разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 6,45 %, однако разница с группой контроля составила 53,07 %. Во второй экспериментальной группе разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 6,59 %. Стоит отметить, что количество сперматид во второй экспериментальной группе было выше, чем в первой на 26 %, но ниже, чем в группе контроля на 36,57 %.

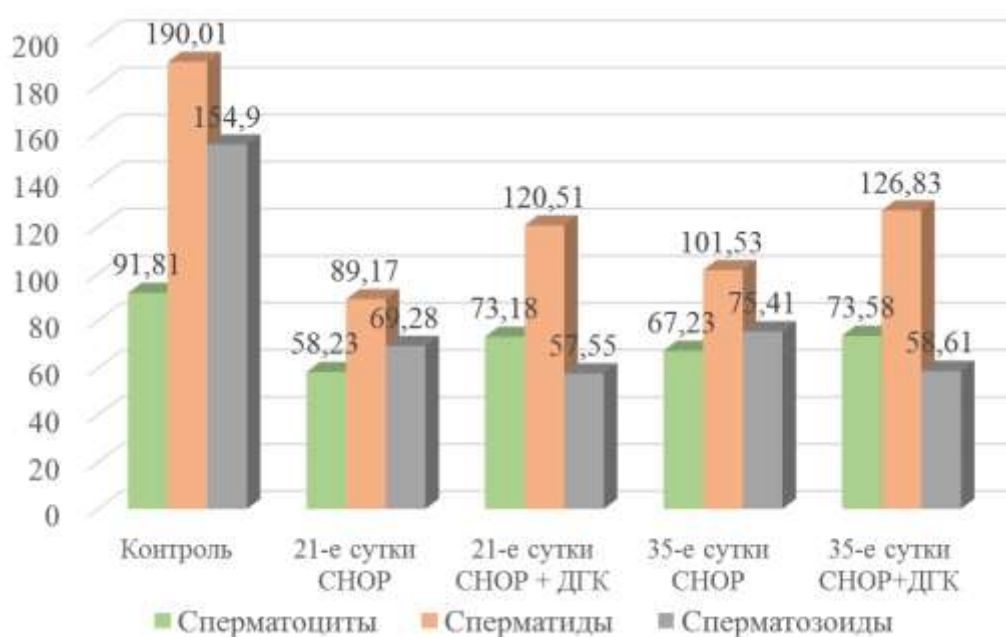


Рисунок 28 – Динамические изменения среднего количества сперматоцитов, сперматид, сперматозоидов в канальце исследуемых животных (21–35-е сутки)

На 35-е сутки были аналогичные изменения в количестве сперматид. Количество сперматид в первой экспериментальной группе выросло на 12,17 %, во второй экспериментальной группе – на 4,98 %. Таким образом, на 35-е сутки показатель во второй экспериментальной группе был на 19,94 % выше, чем в первой экспериментальной группе, но на 33,25 % ниже, чем в группе контроля.

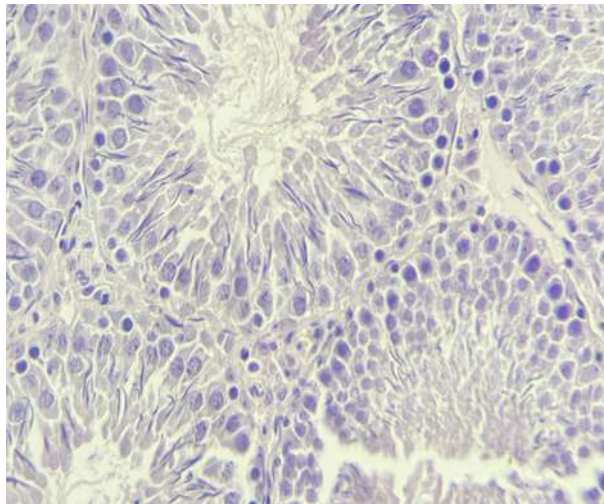


Рисунок 29 – Семенник крысы 1-й экспериментальной группы, 35-е сутки.

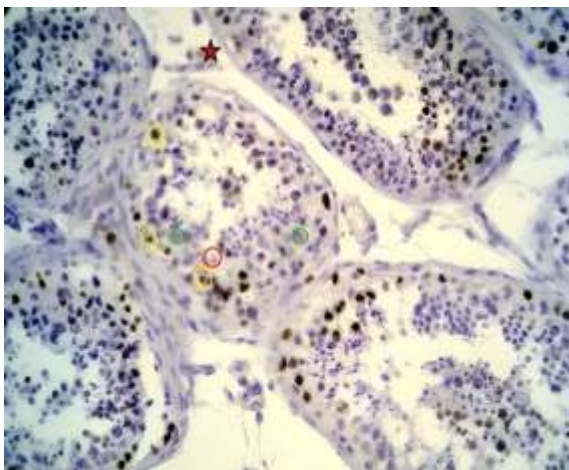
Восстановление клеток сперматогенного эпителия, сохраняются промежутки между сперматогенными клетками, отек стромы, клетки Лейдига с проявлениями зернистой дистрофии. Гем. Эозин. $\times 40$

Несколько иная закономерность отмечалась в количестве сперматозоидов. Так на 21-е сутки в первой экспериментальной группе, в сравнении с 14-ми сутками, отмечалось увеличение количества сперматозоидов на 6,76 %, во второй экспериментальной группе – на 3,71 %, таким образом, разница в количестве сперматозоидов между экспериментальными группами составила 16,93 %. Несмотря на увеличение количества сперматозоидов, разница с группой контроля составила 51,31 % и 62,84 % соответственно. На 35-е сутки отмечалось незначительное увеличение сперматозоидов во второй экспериментальной группе, в первой экспериментальной группе происходило увеличение количества сперматозоидов на 8,29 %, таким образом разница со второй экспериментальной группой составила 22,27 %, с группой контроля – 51,31 %.

Полученные результаты демонстрируют динамические изменения показателей пролиферации и апоптотической активности на 21–35-е сутки исследования.

Маркер Ki-67 (маркер пролиферативной активности): в обеих экспериментальных группах отмечалась положительная реакция на антитела

к Ki-67 в ядрах единичных сперматогоний «+». В клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках иммуномечения на Ki-67 не обнаружено «–». В первой экспериментальной группе на 21-е сутки отмечалось достоверное падение уровня Ki-67 с 14,3 % до 6,5 % ($P < 0,01$), во второй экспериментальной группе – с 14,3 % до 6,9 % ($P < 0,01$), что указывает на сохраняющееся угнетение пролиферативной активности спустя 21-е сутки после проведенной химиотерапии, на 35-е сутки отмечалось восстановление пролиферативной активности: в первой экспериментальной группе с 14,3 % показатель снижался до 7,3 %, во второй группе – до 8,1 % (Рисунок 30).



Примечание. Желтым цветом отмечена сперматогония, зеленым – сперматоцит I, красным – сперматоцит II; звездочкой – клетка Лейдига.

Рисунок 30 – Семенник крысы второй экспериментальной группы на 35-е сутки, интрануклеарная реакция с Ki-67 высокой интенсивности в отдельных клетках сперматогенного эпителия (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм)

Маркер p53 (белок проапоптотической активности): в обеих экспериментальных группах отмечалась положительная реакция на антитела p53 в сперматогониях «++», в клетках Лейдига и миоидных клетках экспрессии p53 не обнаружено «–». В первой экспериментальной группе на 21-е сутки исследования

отмечалось достоверное увеличение уровня p53 с 4,1 % до 14,7 % ($P < 0,01$), во второй экспериментальной группе также отмечалось достоверное увеличение с 4,1 % до 11,2 %. На 35-е сутки отмечалось снижение иммуномеченных клеток p53 с 18,7 % до 12,5 % в первой экспериментальной группе ($P < 0,01$), и с 16,9 % до 7,8 % во второй экспериментальной группе ($P < 0,01$).

Caspase-3 (маркер апоптотической активности): в извитых семенных канальцах животных обеих экспериментальных групп при блоке созревания отмечалась положительная иммунная реакция на caspase-3 в цитоплазме сперматогоний «++», в клетках Лейдига и в миоидных клетках экспрессия caspase-3 не выявлено «—». Активность маркера caspase-3 достоверно снижалась к 21-м суткам исследования у животных из обеих экспериментальных групп. В первой экспериментальной группе отмечалось понижение с 18,7 % до 15,9 %, во второй экспериментальной группе с 16,9 % до 14,3 %. На 35-е сутки исследования тенденция к достоверному снижению уровня caspase-3 сохранялась: 15,9 % до 12,5 % в первой экспериментальной группе и с 14,3 % до 9,7 % во второй экспериментальной группе.

CD117 (фактор дифференцировки мужских половых клеток): экспрессии маркера CD117 в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках положительная («+»). Наблюдалось незначительное увеличение количества клеток, экспрессирующий CD 117, на 21-е сутки исследования. В первой экспериментальной группе отмечалось увеличение экспрессии с 1,7 % до 4,2 %, во второй экспериментальной группе – с 2,9 % до 5,1 %. На 35-е сутки исследования отмечалось увеличение экспрессии с 4,2 % до 7,3 % в первой группе, и с 5,1 % до 8,1 % – во второй экспериментальной группе.

Резюме. Результаты исследования свидетельствуют о персистенции структурно-функциональных нарушений в сперматогенном эпителии семенников лабораторных крыс, наблюдавшихся в течение 35 суток после двукратного введения химиотерапевтического комплекса по протоколу СНОР. Морфологический анализ выявил следующие устойчивые патологические изменения: дезорганизацию архитектоники сперматогенного эпителия,

выраженные дистрофические изменения клеточных элементов, проявляющиеся вакуолизацией цитоплазмы и её зернистой дистрофией, наличие участков с полной деструкцией сперматогенного эпителия (синдром клеток Сертоли). Данные, полученные при иммуногистохимическом исследовании, свидетельствуют о долговременном влиянии комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР на процессы пролиферации и апоптоза в тканях семенников. Динамическое изменение индексов Ki-67, p53 и Caspase-3 отражает сложный механизм восстановления тканей после токсического воздействия препаратов. Постепенная нормализация уровней указанных белков позволяет предположить наличие компенсаторных механизмов, направленных на поддержание гомеостаза репродуктивной системы организма. Процесс полного восстановления функций требует длительного времени и характеризуется поэтапностью восстановительных реакций.

Таблица 12 – Динамические изменения клеток сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп из расчета на один семенной каналец (21–35-е сутки) (Ме)

Параметры	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		СНОР 21-е сут.	ДГК 21-е сут.	СНОР 35-е сут.	ДГК 35-е сут.
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
1	2	3	4	5	6
Сперматогенные клетки	490,11 (481,61; 497,28) $P_1 < 0,01$	260,71 (245,18; 284,36) $P_2 < 0,01$	297,37 (261,32; 311,12) $P_3 < 0,01$	289,34 (274,81; 297,52) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	301,19 (293,18; 317,15) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии (общ.)	53,31 (51,63; 55,45) $P_1 < 0,01$	44,03 (41,17; 46,35)	46,13 (39,64; 47,65) $P_3 < 0,01$	45,17 (42,84; 47,53) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	47,21 (45,53; 50,23) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии, %	10,87 (10,72; 11,14) $P_1 < 0,01$	16,88 (16,79; 17,07)	15,24 (15,17; 15,31) $P_3 < 0,01$	15,61 (15,59; 15,97) $P_4 < 0,01$	15,67 (15,53; 15,84) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии А	13,08 (12,67; 13,59) $P_1 < 0,01$	10,15 (9,85; 12,11)	11,54 (10,93; 12,71) $P_3 < 0,01$	11,26 (11,01; 12,27) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	12,06 (11,97; 12,41) $P_6 < 0,01$
Сперматогонии В	40,22 (38,96; 44,31) $P_1 < 0,01$	33,88 (31,32; 34,25)	34,59 (28,71; 34,94) $P_3 < 0,01$	33,91 (33,83; 35,26) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	35,15 (33,56; 37,82) $P_6 < 0,01$
Сперматоциты	91,81 (89,36; 93,91) $P_1 < 0,01$	58,23 (53,73; 63,71) $P_2 < 0,01$	73,18 (64,25; 77,27) $P_3 < 0,01$	67,23 (63,78; 73,21) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	73,58 (72,15; 78,93) $P_6 < 0,01$
Сперматоциты, %	18,73 (18,55; 18,88) $P_1 < 0,01$	22,33 (21,09; 22,4)	24,6 (24,58; 24,83) $P_3 < 0,01$	23,23 (23,21; 24,61) $P_4 < 0,01$	24,76 (24,61; 24,89) $P_6 < 0,01$
Сперматиды (общ.)	190,01 (182,86; 196,26) $P_1 < 0,01$	89,17 (83,21; 98,65) $P_2 < 0,01$	120,51 (104,63; 126,43) $P_3 < 0,01$	101,53 (96,10; 104,75) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	126,83 (117,35; 127,39) $P_6 < 0,01$
Сперматиды, %	38,76 (37,96; 39,46) $P_1 < 0,01$	34,20 (33,93; 34,69) $P_2 < 0,01$	40,52 (40,04; 40,85) $P_3 < 0,01$	35,08 (34,97; 35,21) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	40,11 (40,03; 40,17) $P_6 < 0,01$

Продолжение Таблицы 12

1	2	3	4	5	6
Ранние сперматиды	132,14 (128,43; 136,15) $P_1 < 0,01$	60,11 (54,88; 67,47) $P_2 < 0,01$	75,35 (71,37; 78,61) $P_3 < 0,01$	61,27 (58,74; 62,14) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	78,04 (77,13; 78,51) $P_6 < 0,01$
Поздние сперматиды	57,87 (54,43; 60,11) $P_1 < 0,01$	29,06 (28,23; 31,18) $P_2 < 0,01$	45,16 (33,26; 47,82) $P_3 < 0,01$	40,26 (37,36; 42,61) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	48,79 (40,22; 48,88) $P_6 < 0,01$
Сперматозоиды	154,92 (149,36; 161,03) $P_1 < 0,01$	69,28 (63,07; 75,65) $P_2 < 0,01$	57,55 (50,09; 60,38) $P_3 < 0,01$	75,41 (71,39; 78,06) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	58,61 (56,71; 61,33) $P_6 < 0,01$
Сперматозоиды, %	31,21 (31,01; 32,38) $P_1 < 0,01$	26,57 (25,73; 26,6) $P_2 < 0,01$	19,35 (19,17; 19,41) $P_3 < 0,01$	26,06 (25,98; 26,24) $P_4 < 0,01; P_5 < 0,01$	19,46 (19,34; 19,53) $P_6 < 0,01$
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 21-е сутки СНОР и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 35-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 35-е сутки СНОР и 35-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 35-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

3.2.3 Морфометрическая характеристика эндокринного аппарата семенников крыс экспериментальных групп

При гистологическом исследовании эндокринного аппарата семенников крыс на 21-е, 35-е сутки в обеих экспериментальных группах отмечалось утолщение белочной оболочки, полнокровие и отек стромы, утолщение стенок кровеносных сосудов, отек интерстициальных островков, с диффузным разрастанием соединительной ткани. В связи с выраженным отеком на 21-е сутки аналогично 14-м суткам островки плохо определялись, также сохранялась тенденция к сдавлению цитоплазмы эндокриноцитов, что приводило к тому, что клетки Лейдига приобретали вид сморщенных клеток, с ядром неправильной формы, накоплением зерен липофусцина, что служило подтверждением дистрофических изменений в эндокриноцитах.

При исследовании клеток Лейдига экспериментальных групп, отмечалась следующая картина: на 21-е сутки исследования в первой экспериментальной группе обнаруживалось уменьшение клеток Лейдига малого размера на 4 % и увеличение средних и малых форм на 2 % в сравнении с 14-ми сутками исследования. Во второй экспериментальной группе происходили аналогичные изменения: количество малых форм эндокриноцитов уменьшалось на 6 %, в то время как количество средних и больших форм увеличивалось на 5 % и 1 % соответственно, в сравнении с 14-ми сутками. Таким образом, показатели морфофункциональных форм клеток на 21-е сутки приближались к показателям из группы контроля.

На 35-е сутки в первой экспериментальной группе отмечалось снижение малых форм эндокриноцитов на 9 % и увеличение средних и больших форм эндокриноцитов на 2 % и 7 % соответственно. Во второй экспериментальной группе отмечалось снижение средних форм эндокриноцитов на 3 % и увеличение малых и больших размеров на 2 % и 1 % соответственно (Рисунок 31).

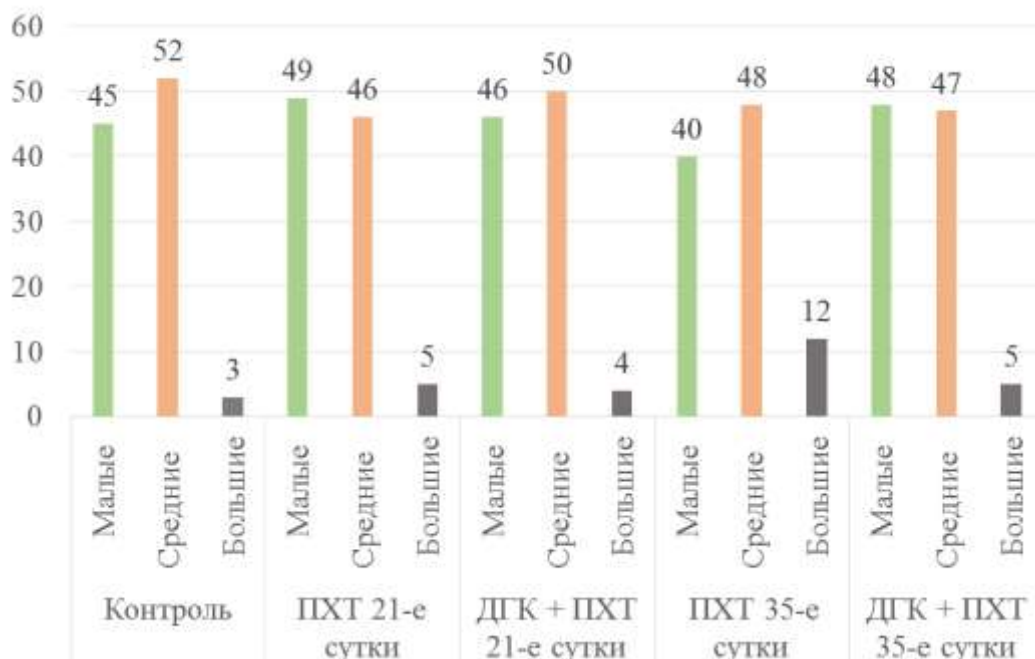


Рисунок 31 – Динамика изменений количества морфофункциональных форм клеток Лейдига у животных экспериментальных групп (21–35-е сутки)

Динамические изменения содержания тестостерона и лютеинизирующего гормона в плазме крыс группы контроля и экспериментальных групп на 21–35-е сутки, отражены в Таблице 5.

Результаты морфометрических исследований показали, что в клетках Лейдига у крыс первой экспериментальной группы на 21-е сутки происходило увеличение объема эндокриноцитов на 1,61 % в сравнении с 14-ми сутками исследования. Во второй экспериментальной группе разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 6,53 %. Таким образом, на 21-е сутки исследования объем клеток Лейдига во второй экспериментальной группе был на 8,54 % выше, чем показатель объема первой экспериментальной группы, но ниже на 11,48 % чем в группе контроля (Рисунок 32).

На 35-е сутки исследования также отмечалось увеличение объема эндокриноцитов, так в первой экспериментальной группе на 35-е сутки исследования разница с 21-ми сутками составила 18,93 %, во второй экспериментальной группе – 9,56 %. Стоит отметить, что на 35-е сутки

наибольший объем клеток Лейдига наблюдали в первой экспериментальной группе, а именно на 0,23 % больше, чем в группе контроля, и на 2,35 % больше, чем во второй экспериментальной группе.

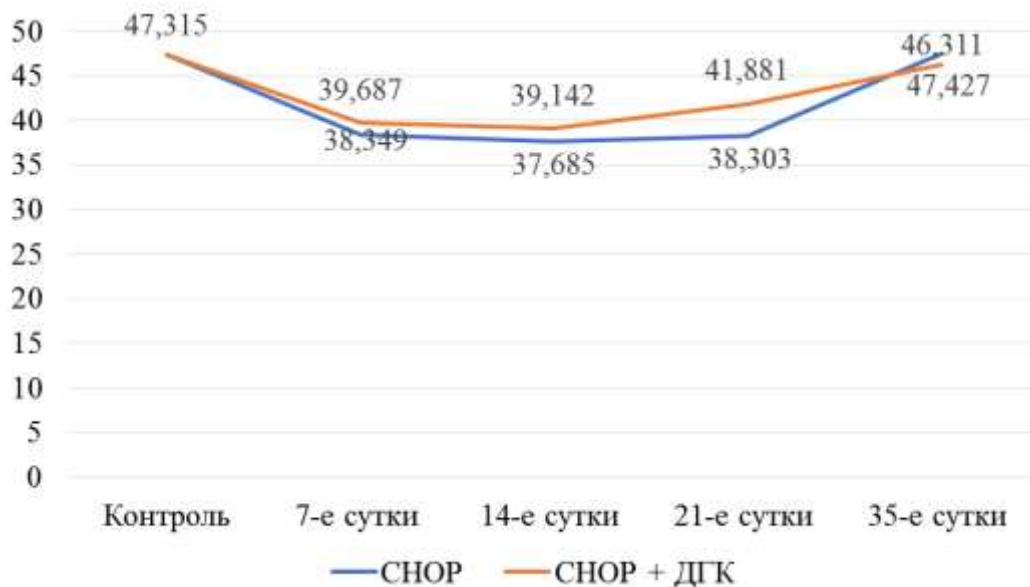


Рисунок 32 – Динамические изменения объема клеток Лейдига в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки)

Одновременно с увеличением объема эндокриноцитов происходило и увеличение диаметра ядер клеток Лейдига. По результатам исследования было установлено, что в первой экспериментальной группе разница между 14-ми сутками и 21-ми сутками составила 0,79 %, между 21-ми и 35-ми сутками 1,2 %. Во второй экспериментальной группе также происходило увеличение диаметра ядер, разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 0,75 %, между 21-ми и 35-ми сутками 1,13 %. Как на 21-е, так и на 35-е сутки исследования показатель диаметра ядер клеток Лейдига незначительно, но был выше во второй экспериментальной группе. Вышеуказанные изменения нашли отражение в увеличении индекса активности клеток Лейдига, и в увеличении количества тестостерона у животных экспериментальных групп (Рисунок 33).

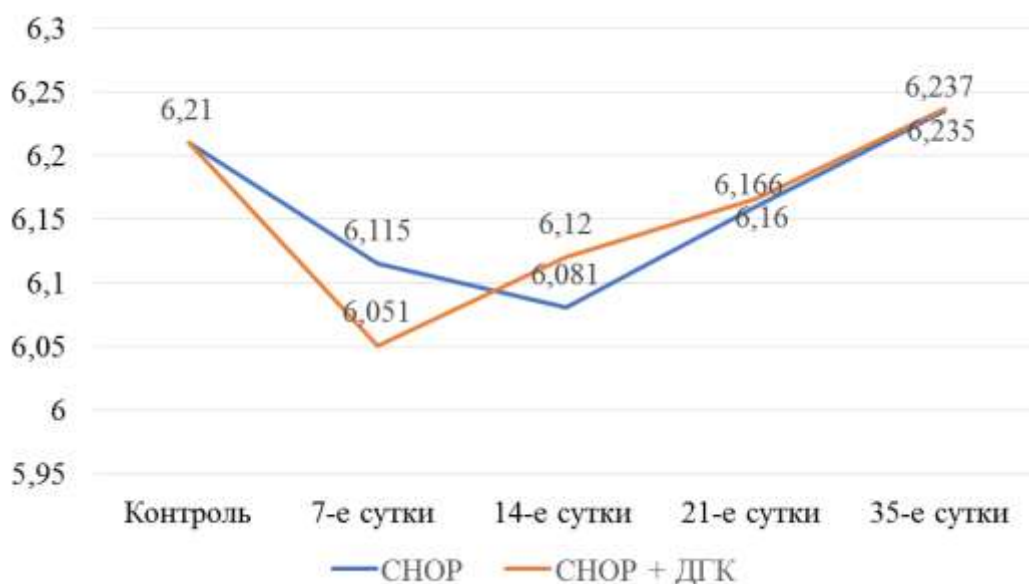


Рисунок 33 – Динамические изменения диаметра ядер клеток Лейдига в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки)

Начиная с 21-х суток, в эндокринном аппарате семенников возникают компенсаторно-приспособительные изменения в виде увеличения количества больших форм эндокриноцитов на фоне высокого показателя количества малых форм, что, по нашему мнению, приводит к повышению индекса активности клеток Лейдига и постепенному восстановлению гормонпродуцирующей функции с увеличением концентрации тестостерона в сыворотке крови, несмотря на сниженное относительное количество клеток Лейдига, а так же сохраняющийся малый размер ядер и объема клеток. На 35-е сутки отмечались изменения в виде накопления в эндокриноцитах липофусцина, что могло возникнуть на фоне гипоксии, возникшей вследствие утолщения стенки и уменьшения просвета сосудов микроциркуляторного русла. На 35-е сутки происходило уменьшение количества клеток Лейдига малых форм и увеличение средних и больших форм эндокриноцитов, что в свою очередь, коррелировало с увеличением уровня тестостерона в сыворотке крови.

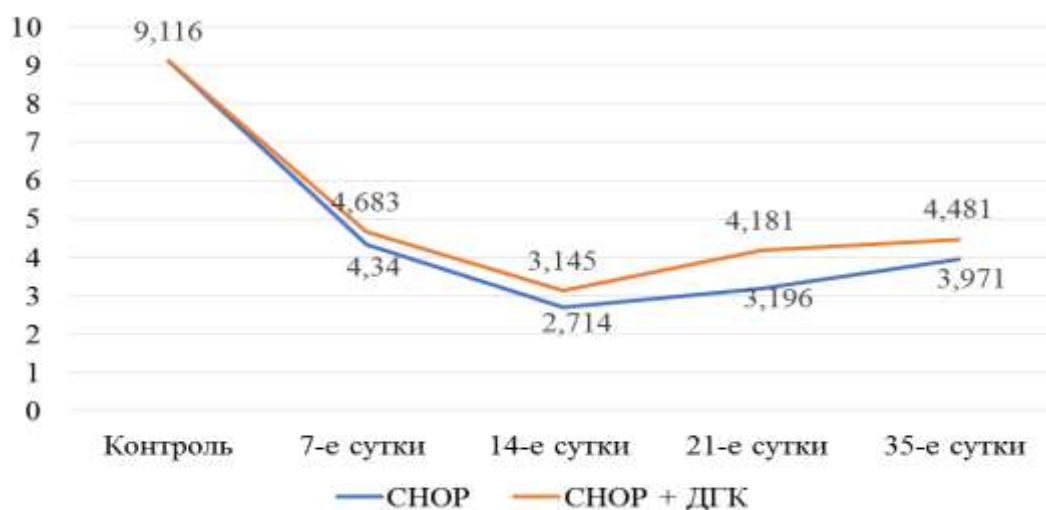


Рисунок 34 – Динамические изменения уровня тестостерона в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки)

Таблица 13 – Результаты морфометрического исследования клеток Лейдига семенников крыс экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Me)

Показатели	Группа контроль	Экспериментальные группы в различные периоды наблюдения			
		21-е сутки СНОР	21-е сутки СНОР + ДГК	35-е сутки СНОР	35-е сутки СНОР + ДГК
Размер выборки (n)	10	10	10	10	10
Диаметр ядра клетки Лейдига (мкм)	6,210 (6,182; 6,285)	6,160 (6,122; 6,177)	6,166 (6,140; 6,217)	6,235 (6,182; 6,295)	6,237 (6,205; 6,312)
Объем клетки Лейдига (мкм ³)	47,315 (46,905; 48,818)	38,303 (33,425; 41,230)	41,881 (38,642; 44,152)	47,427 (40,584; 53,017)	46,311 (45,751; 52,781)
Относительное количество клеток Лейдига (n)	10,8 (10,4; 11,2)	8,4 (8,1; 8,9)	8,7 (8,5; 8,9)	8,6 (8,3; 9,0)	8,9 (8,5; 9,3)
Индекс активности клеток Лейдига	1,189 (1,171; 1,215)	1,091 (1,047; 1,118)	1,100 (1,056; 1,168)	1,136 (1,113; 1,211)	1,106 (1,043; 1,116)
Примечание: P ₁ – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР; P ₂ – достоверность различий между группой 21-е сутки СНОР и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P ₃ – достоверность различий между группой контроля и группой 21-е сутки СНОР + ДГК; P ₄ – достоверность различий между группой контроля и группой 35-е сутки СНОР; P ₅ – достоверность различий между группой 35-е сутки СНОР и 35-е сутки СНОР + ДГК; P ₆ – достоверность различий между группой контроля и 35-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

Резюме. Проведенное исследование эндокринного аппарата семенников крыс после введения химиотерапевтического комплекса по протоколу СНОР выявило стойкие структурно-функциональные изменения, сохраняющиеся на протяжении всего экспериментального периода. Гистологический анализ показал, что несмотря на персистирующие морфологические нарушения, в тканях семенников активируются компенсаторные механизмы, способствующие восстановлению гормонсинтезирующей функции. Важно отметить, что включение дигидрокверцетина в схему терапии достоверно снижало выраженность токсического эффекта химиотерапевтических препаратов.

3.2.4 Иммуноферментный анализ плазмы крови крыс экспериментальных групп

Анализ представленных данных демонстрирует, что на 21-е сутки после применение комплекса противоопухолевых препаратов наблюдалось незначительное увеличение уровня тестостерона у особей обеих экспериментальных групп в сравнении с показателями на 14-е сутки. Конкретнее, первая группа продемонстрировала увеличение уровня гормона на 14,21 % ($p < 0,01$), но значение тестостерона оставалось ниже показателя контрольной группы на 65,32 % ($p < 0,01$). Во второй экспериментальной группе также отмечено увеличение содержания тестостерона – на 24,76 % ($p < 0,01$), что подтверждает высокий компенсаторный потенциал у экспериментальных животных. Отмеченная разница в степени угнетающего воздействия между двумя экспериментальными группами составила 23,68 % ($p < 0,01$).

На 35-е сутки также отмечалось увеличение тестостерона в обеих экспериментальных группах, таким образом, в первой экспериментальной группе разница с группой контроля составила 56,46 % ($p < 0,01$), во второй экспериментальной группе разница с группой контроля составила 50,87 % ($p < 0,01$), разница между экспериментальными группами составила 11,38 %.

Несколько иная картина наблюдалась при исследовании лютеинизирующего гормона. В обеих экспериментальных группах отмечалось его незначительное снижение на 14-е сутки исследования. Таким образом в первой экспериментальной группе разница между 21-ми и 14-ми сутками составила 6,69 %, во второй экспериментальной группе разница составила 25,97 %. Несмотря на снижение количества лютеинизирующего гормона, по сравнению с 14-и сутками, в обеих экспериментальных группах по-прежнему отмечалась статистически значимая разница с группой контроля.

Одновременно с повышением концентрации тестостерона и снижением содержания лютеинизирующего гормона отмечалась нормализация уровня фолликулостимулирующего гормона, что в свою очередь, сопровождалось восстановлением сперматогенного эпителия. Так в первой экспериментальной группе на 21-е сутки разница с 14-и сутками 14,43 % с группой контроля – 74,32 %. Во второй экспериментальной группе разница с контролем составила 73,22 %, разница между экспериментальными группами – 4,13 %.

К 35-м суткам наблюдалась устойчивая динамика снижения уровня фолликулостимулирующего гормона, вследствие чего значения данного показателя в обеих экспериментальных группах приблизились к соответствующим показателям контрольной группы.

Таблица 14 – Динамические изменения уровня половых гормонов животных контрольной и экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме)

Параметры	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		СНОР	ДГК	СНОР	ДГК
		21-е сут.	21-е сут.	35-е сут.	35-е сут.
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
ФСГ (МЕ/л)	1,43 (0,98; 2,21) $P_1 < 0,01$;	5,57 (4,31; 6,79)	5,34 (3,52; 7,12) $P_3 < 0,01$;	3,41 (2,19; 4,93) $P_4 < 0,01$;	2,74 (1,78; 4,41) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;

Продолжение Таблицы 14

Параметры	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		СНОР	ДГК	СНОР	ДГК
		21-е сут.	21-е сут.	35-е сут.	35-е сут.
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
ЛГ (МЕ/л)	4,61 (3,35; 5,81) $P_1 < 0,01$;	13,09 (12,42; 13,81) $P_2 < 0,01$;	11,205 (10,24; 12,12) $P_3 < 0,01$;	9,34 (8,49; 9,75) $P_4 < 0,01$;	6,58 (5,715; 7,521) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$
Тестостерон (нмоль/л)	9,12 (8,146; 9,801) $P_1 < 0,01$;	3,19 (2,491; 4,051)	4,18 (3,514; 4,849) $P_3 < 0,01$;	3,97 (3,008; 4,934) $P_4 < 0,01$;	4,48 (3,597; 4,832) $P_6 < 0,01$;
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

Резюме. Данные, полученные при изучении иммуноферментного анализа половых гормонов экспериментальных животных после химиотерапевтического воздействия по протоколу СНОР позволило выявить следующие закономерности: на 21-е сутки отмечено статистически значимое ($p < 0,01$) увеличение уровня тестостерона в обеих группах (на 14,21 % в первой и 24,76 % во второй группе) по сравнению с 14-ми сутками. К 35-м суткам сохранялась значительная разница с контрольной группой (56,46 % и 50,87 % соответственно). Выявлена межгрупповая разница в эффективности восстановления (23,68 % на 21-е и 11,38 % на 35-е сутки). Восстановление уровня тестостерона коррелировало с нормализацией ФСГ. Обратная динамика ЛГ и тестостерона свидетельствует о компенсаторной активации гипоталамо-гипофизарной системы. Выявленные изменения гормонального профиля сопровождались морфологическим восстановлением сперматогенного эпителия

3.2.5 Цитологическое исследование эпидидимального содержимого крыс экспериментальных групп

Согласно полученным данным, общее количество сперматозоидов в эпидидимальной суспензии у крыс первой экспериментальной группы на 21-е сутки составило 115,37 млн в 1 мл, что на 39,28 % меньше, чем в группе контроля (190,21 млн в 1 мл) ($< 0,01$) и больше на 10,59 % чем количество сперматозоидов на 14-сутки. Во второй экспериментальной группе на 21-е сутки отмечалось незначительное увеличение количества сперматозоидов в сравнении с 14-ми сутками. Стоит отметить, что на 21-е сутки общее количество сперматозоидов в первой экспериментальной группе было выше, чем во второй, разница составила 3,61 %. При этом на 21-е сутки количество патологических форм сперматозоидов в первой экспериментальной группе составила 35,81 млн в 1 мл, что на 24,01 % меньше, чем на 14-е сутки (47,13 млн в 1 мл), но несмотря на уменьшение количества патологических форм сперматозоидов к 21-ым суткам, их количество на 38,01 % было больше чем в группе контроля. Во второй экспериментальной группе, аналогично первой, на 21-е сутки наблюдалось уменьшение количества патологических форм на 50,19 % ($< 0,01$) (Рисунок 35). Также на 21-е сутки во второй экспериментальной группе количество патологических форм сперматозоидов было незначительно меньше, чем в группе контроля. Разница между первой и второй экспериментальной группами составила 40,88 % ($< 0,01$).

На 35-е сутки в первой экспериментальной группе отмечалось увеличение общего количества сперматозоидов на 3,86 % в сравнении с 21-ми сутками, таким образом разница с группой контроля составила 36,84 % ($< 0,01$). Во второй экспериментальной группе отмечалось незначительное увеличение общего количества сперматозоидов, таким образом, разница между 21-ми и 35-ми сутками составила 2,67 %, разница с первой экспериментальной группой составила 4,78 %. На фоне увеличения общего количества сперматозоидов, отмечалось снижение патологических форм. Так в первой экспериментальной группе разница в количестве между 21-ми и 35-ми сутки составила 24,41 %, во

второй экспериментальной группе – 24,27 %. Стоит отметить, что на 35-е сутки во второй экспериментальной группе, не смотря на незначительную разницу, в общем количестве сперматозоидов с первой экспериментальной группой, наблюдалась значительная разница в количестве патологических форм в количественном и в процентном соотношении, а именно 11,04 млн в 1 мл, что составило 40,83 % (Рисунок 35).

Патологические формы сперматозоидов в обеих исследуемых группах характеризовались наличием следующих распространенных нарушений: аморфность головки, изменение размера головки (уменьшение или увеличение), полиспермия (наличие двойной головки), анофтальмия (головка без хвоста), укороченность хвоста и спирализация хвоста. Данные нарушения негативно влияли на подвижность сперматозоидов, способность к оплодотворению яйцеклетки и общую жизнеспособность, что повышает вероятность развития бесплодия и возникновения генетических дефектов у потомства (Рисунок 36).

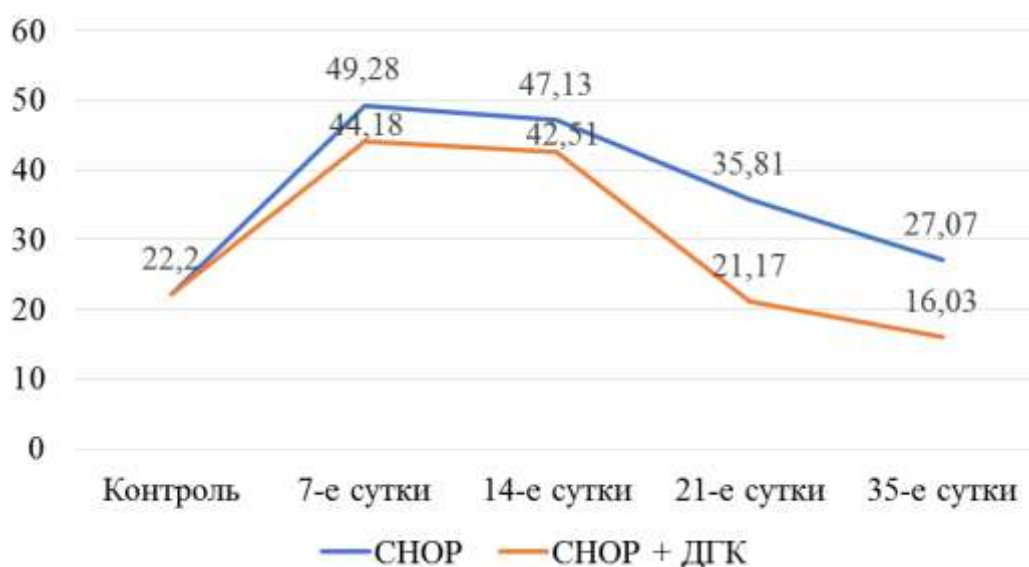


Рисунок 35 – Динамические изменения количества патологических форм сперматозоидов в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки)

На фоне увеличения общего количества сперматозоидов и снижении количества патологических форм у животных обеих экспериментальных групп

происходит увеличение количества фертильных форм. Так на 21-е сутки в первой экспериментальной группе количество фертильных форм увеличилось на 12,95 % в сравнении с 14-ми сутками, на 35-е сутки тенденция к увеличению фертильных форм сохранилась, разница между 21-ми и 35-ми сутками составила 27,97 % ($< 0,01$). Во второй экспериментальной группе также происходило увеличение количества фертильных форм: так разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 9,09 %, между 21-ми и 35-ми сутками разница составила 13,67 %. Таким образом, несмотря на то, что общее количество сперматозоидов во второй группе было меньше, чем в первой, количество фертильных форм сперматозоидов во второй экспериментальной группе было на 31,48 % ($< 0,01$) выше, чем в первой экспериментальной группе.

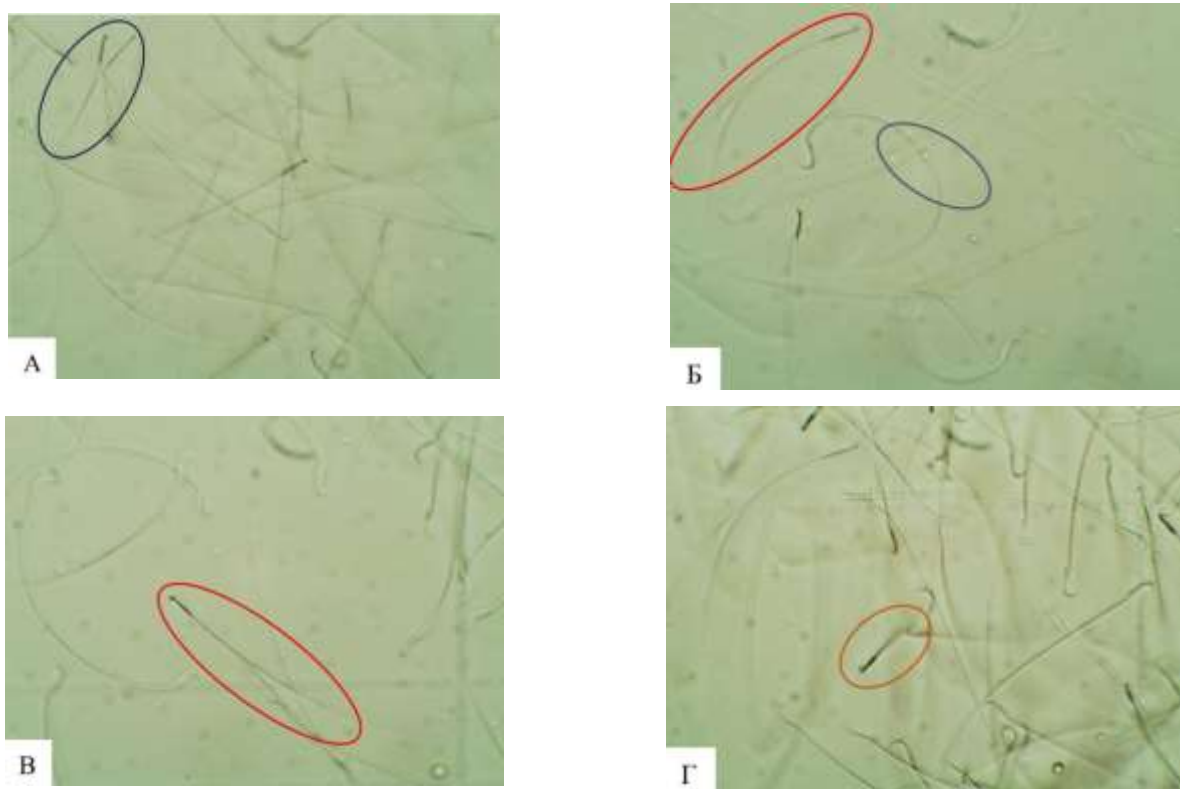


Рисунок 36 – Патологические формы сперматозоидов крысы 1-ой экспериментальной группы 35-е сутки: А – синим цветом выделено удвоение головки; Б – красным цветом выделено удвоение хвоста; голубым – цитоплазматическая капля; В – красным цветом выделено удвоение хвоста; Г – оранжевым цветом выделено отсутствие хвоста.

Увеличение фракции фертильных сперматозоидов происходило за счет

увеличения прогрессивно-подвижных и малоподвижных форм сперматозоидов (Рисунки 36 и 37). Так в первой экспериментальной группе в фракции прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 7,91 %, между 21-ми и 35-ми сутками разница составила 35,4 % ($< 0,01$). Во второй экспериментальной группе разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 37,26 % ($< 0,01$), разница между 21-ми и 35-ми сутками составила 13,67 % ($< 0,01$). На 35-е сутки было установлено достоверное отличие количества фертильных сперматозоидов у животных первой и второй экспериментальных групп, разница между группами в сутки составила 36,44 % ($< 0,01$). Количество малоподвижных сперматозоидов также незначительно увеличивалось в обеих экспериментальных группах. Так в первой экспериментальной группе на 21-е сутки показатель малоподвижных сперматозоидов вырос на 18,35 % в сравнении с 14-ми суткам. На 35-е сутки также отмечалось достоверное увеличение количества малоподвижных форм сперматозоидов на 17,19 % в сравнении с 21-ми сутками. Во второй экспериментальной группе разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 18,78 % ($< 0,01$), между 21-ми и 35-ми сутками – 20,65 % ($< 0,01$). При сравнении количества малоподвижных форм сперматозоидов на 35-е сутки в экспериментальных группах было установлено, что количество малоподвижных сперматозоидов было на 23,55 % больше во второй экспериментальной группе, чем в первой.

Кроме увеличения количества фертильных форм, начиная с 21-х суток первая экспериментальная группа характеризовалась повышением количества не фертильных форм сперматозоидов, таким образом разница между 14-ми и 21-ми сутками составила 9,62 %. С 35-х суток в первой экспериментальной группе отмечалось уменьшение количества не фертильных форм сперматозоидов, разница с 21-ми сутками составила 10,1 %. Во второй экспериментальной группе на 21-е сутки наблюдалось незначительное снижение не фертильных форм сперматозоидов в сравнении с 14-ми сутками, на 35-е сутки тенденция к достоверному уменьшению количества не фертильных форм сперматозоидов сохранялась. Разница между 21-ми и 35-ми сутками составила 11,75 %, разница

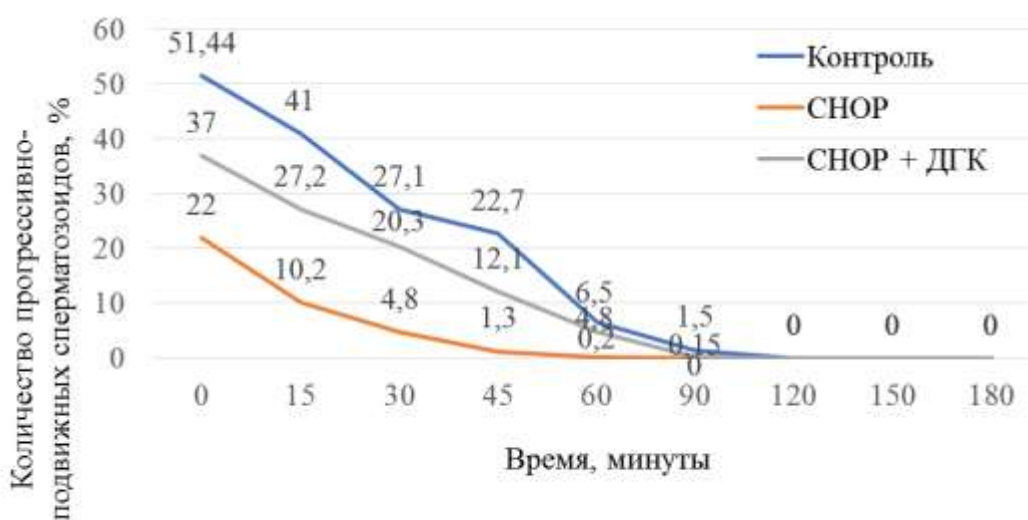
между количеством не фертильных форм сперматозоидов экспериментальных групп на 35-е сутки составила 36,75 % ($< 0,01$).

Во фракции дергающихся форм сперматозоидов из первой экспериментальной группы на 21-е сутки отмечалось увеличение в сравнении с 14-ми сутками на 6,4 %, к 35-м суткам наблюдалось снижение на 3,02 %. Во второй экспериментальной группе на 21-е сутки наблюдалось уменьшение количества дергающихся форм сперматозоидов в сравнении с 14-ми сутками на 16,88 %, на 35-е сутки продолжалось снижение дергающихся клеток, разница с 21-ми сутками составила 11,37 %. Разница между первой и второй экспериментальными группами на 35-е сутки составила 28,28 % ($< 0,01$).

Начиная с 21-х суток в обеих экспериментальных группах отмечалось незначительное увеличение количества неподвижных форм сперматозоидов, так в первой экспериментальной группе разница между 21-ми и 14-ми сутками составила 12,36 %, во второй экспериментальной группе разница составила 27,42 %. К 35-м суткам в обеих экспериментальных группах обнаруживалось снижение неподвижных форм, так в первой экспериментальной группе разница между 21-ми и 35-ми сутками составила 3,02 %, во второй экспериментальной группе – 11,37 %, разница между первой и второй экспериментальной группами составила 28,28 %.

На 35-е сутки с 1-й по 15-ю минуту наблюдения отмечалось значимое снижение прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов в обеих экспериментальных группах, разница между первой экспериментальной группой и группой контроля составила 29,44 %, между второй экспериментальной группой и группой контроля – 14,44 %. На всех временных отрезках значение прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов в группе с добавлением антиоксиданта было выше, чем в первой экспериментальной группе. Следует отметить, что у крыс из группы контроля прогрессивно-подвижные сперматозоиды сохранялись вплоть до 90-й минуты, в то время как в первой экспериментальной группе аналогичных значений (1,3 %) достигали уже на 45-й минуте, во второй экспериментальной группе на 60-й минуте отмечался показатель 4,8 %.

Во фракции слабоподвижных сперматозоидов на 35-е сутки с первой минуты также отмечалось значимое снижение количества сперматозоидов. На 15-й минуте наблюдалось пиковое увеличение количества слабоподвижных сперматозоидов во всех группах. Однако разница между группой контроля и первой экспериментальной группой составила 10,4 %, между второй экспериментальной группой и группой контроля разница составила 7,24 %. Разница между экспериментальными группами составила 3 %. В группе контроля показатель слабоподвижных сперматозоидов приближался к отметке 0 на 120-й минуте, в то время как в обеих экспериментальных группах значение близкое к 0 наблюдалось на 60-й минуте.



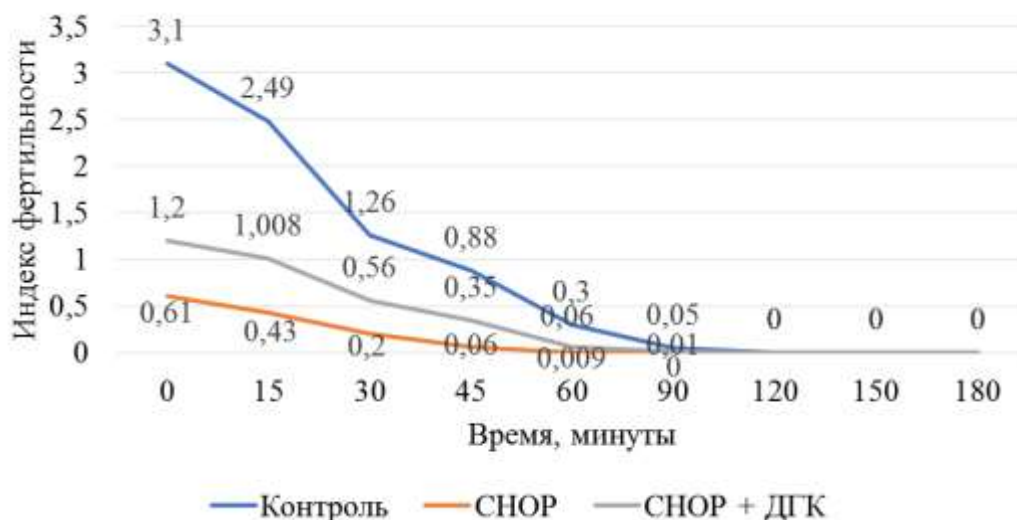
Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – количество прогрессивно подвижных сперматозоидов, выраженное в % (0–60).

Рисунок 37 – Динамические изменения фракции прогрессивно подвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 35-е сутки

С первой минуты во фракции «дергающихся» сперматозоидов наибольший процент приходится на первую экспериментальную группу, далее процент «дергающихся» форм постепенно снижается, и приближается к отметке «0» на

120-й минуте исследования. Во второй экспериментальной группе к 15-й минуте исследования происходит пиковое повышение, после чего так же, как и в первой экспериментальной группе происходит постепенное снижение «дергающихся» форм сперматозоидов и приближение к отметке «0» на 120-й минуте исследования.

Наибольший процент неподвижных форм сперматозоидов приходится на первую экспериментальную группу. Таким образом, на 120-й минуте исследования 100 % сперматозоидов у животных из первой экспериментальной группы становились неподвижными, в случае со второй группой на 120-й минуте сохранялись единичные подвижные сперматозоиды, в группе контроля подвижные сперматозоиды сохранялись вплоть до 150-й минуты исследования.



Примечание. Горизонтальная ось – время в минутах (0–180), вертикальная ось – индекс фертильности.

Рисунок 38 – Динамические изменения индекса фертильности животных контрольной и экспериментальных групп на 35-е сутки

Резюме. Проведенный цитологический анализ эпидидимального содержимого свидетельствует о комплексном воздействии комплекса химиопрепаратов, входящих в протокол СНОР, на количественные и качественные характеристики сперматозоидов, а также на их функциональную активность.

Таблица 15 – Динамические изменения сперматозоидов в зависимости от сроков проведения исследования (21–35-е сутки)

Показатели	Контроль	Подгруппы крыс экспериментальных групп			
		21-е сутки СНОР	21-е сутки СНОР + ДКГ	35-е сутки СНОР	35-е сутки СНОР + ДКГ
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
1	2	3	4	5	6
Общее количество сперматозоидов (n)	190,01 (186,17; 194,21) $P_1 < 0,01$;	115,37 (110,37; 117,21)	111,21 (107,45; 112,63)	120,01 (115,31; 125,07) $P_4 < 0,01$;	114,27 (111,56; 116,17) $P_5 < 0,01$; $P_6 < 0,01$;
Фертильные формы сперматозоидов (n)	144,01 (140,07; 147,18) $P_1 < 0,01$;	33,51 (30,46; 35,53)	58,47 (56,12; 59,46)	46,41 (43,75; 49,58)	67,73 (62,18; 69,85)
%	75,65 (75,23; 75,78)	29,04 (27,59; 30,31)	52,57 (52,22; 52,79)	38,67 (37,94; 39,64)	59,27 (55,73; 60,127)
Прогрессивно-подвижные формы сперматозоидов (n)	97,92 (93,17; 101,67) $P_1 < 0,01$;	17,33 (15,67; 18,95)	38,19 (35,93; 39,35)	26,87 (24,73; 29,36)	42,17 (39,15; 43,38)
%	51,44 (50,04; 52,35)	15,21 (14,19; 16,16)	34,34 (33,43; 34,93)	22,38 (21,44; 23,47)	36,90 (35,09; 37,341)
Малоподвижные формы сперматозоидов (n)	46,08 (45,51; 49,9) $P_1 < 0,01$;	16,18 (15,02; 16,58)	20,28 (20,19; 20,35)	19,54 (19,02; 20,22)	25,56 (23,03; 26,47)
%	24,21 (23,43; 25,19)	14,02 (13,61; 14,14)	18,23 (17,86; 18,79)	16,29 (15,01; 16,17)	22,37 (20,64; 22,79)
Не фертильные формы сперматозоидов (n),	46,09 (45,58; 46,91) $P_1 < 0,01$;	81,86 (79,91; 81,93)	52,74 (51,33; 53,17)	73,59 (73,27; 75,49)	46,54 (46,32; 49,38)
%	24,21 (23,43; 25,19)	70,96 (69,69; 72,41)	47,43 (47,19; 47,78)	61,31 (60,36; 63,55)	40,73 (39,87; 44,26)
Дергающиеся (n)	36,49 (35,17; 38,27) $P_1 < 0,01$;	37,63 (34,15; 39,21)	29,53 (28,73; 31,15)	36,49 (35,17; 38,27)	26,17 (26,07; 27,9)
%	19,17 (18,89; 19,69)	32,61 (30,94; 33,45)	26,55 (25,83; 28,01)	19,17 (18,89; 19,69)	22,9 (22,44; 25,01)

Продолжение Таблицы 15

1	2	3	4	5	6
Неподвижные (n)	9,61 (7,92; 10,34) $P_1 < 0,01$;	44,23 (42,72; 45,77)	23,21 (22,60; 23,45)	33,61 (34,2; 35,1)	20,37 (20,25; 21,48)
%	5,11 (5,07; 5,33)	38,35 (38,21; 38,96)	20,87 (19,76; 21,35)	28 (29,67; 28,07)	17,82 (17,43; 19,25)
Примечание: P_1 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР; P_2 – достоверность различий между группой 7-е сутки СНОР и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_3 – достоверность различий между группой контроля и группой 7-е сутки СНОР + ДГК; P_4 – достоверность различий между группой контроля и группой 14-е сутки СНОР; P_5 – достоверность различий между группой 14-е сутки СНОР и 14-е сутки СНОР + ДГК; P_6 – достоверность различий между группой контроля и 14-е сутки СНОР + ДГК; n – число наблюдений.					

3.3 Корреляционный анализ

При проведении корреляционного анализа количество достоверных корреляционных связей между показателями исследуемых структурных компонентов и уровнем гормонов в первой экспериментальной группе увеличивалось по мере увеличения количества курсов противоопухолевой терапии и сроков послекурсового периода. В группе с добавлением дигидрокверцетина к 35-м суткам количество достоверных корреляционных связей наблюдалось меньше.

На 7-е сутки исследования в первой экспериментальной группе были выявлены сильные положительные корреляционные связи между массой семенника и толщиной базальной мембраны ($r = 0,96$; $p < 0,01$), массой семенника и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,97$; $p < 0,01$). При изучении уровня гормонов сильные корреляционные связи наблюдались между уровнем тестостерона и толщиной базальной мембраны ($r = 0,95$; $p < 0,01$), уровнем тестостерона и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,89$; $p < 0,01$), а также между уровнем лютеинизирующего гормона и толщиной базальной мембраны ($r = 0,91$; $p < 0,01$), уровнем лютеинизирующего гормона и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,95$; $p < 0,01$) (Таблица 17).

Между показателями уровня фолликулостимулирующего гормона, объема стромы, эндокринным и канальцевым аппаратами отмечались средние положительные и отрицательные корреляционные связи. Сила слабых и средних достоверных корреляционных связей уменьшается по сравнению с аналогичными показателями на 14-е сутки.

В группе с добавлением антиоксиданта сильные корреляционные связи были выявлены между массой семенника и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,86$; $p < 0,01$), между уровнем тестостерона и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,84$; $p < 0,01$), уровнем лютеинизирующего гормона и площадью канальца ($r = 0,92$; $p < 0,01$), а также толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,92$; $p < 0,01$). Кроме того, между уровнем фолликулостимулирующего

гормона отмечались слабые и средние положительные корреляционные связи с толщиной базальной мембраны ($r = 0,19$; $p < 0,01$), количеством сперматогоний ($r = 0,14$; $p < 0,01$), количеством сперматоцитов ($r = 0,34$; $p < 0,01$), количеством сперматид ($r = 0,54$; $p < 0,01$) и сперматозоидов ($r = 0,66$; $p < 0,01$) (Таблица 18).

На 14-е сутки исследования в первой экспериментальной группе оставались высокие положительные корреляционные связи между массой семенника и такими параметрами как: толщина базальной мембраны ($r = 0,94$; $p < 0,01$), толщина сперматогенного эпителия ($r = 0,82$; $p < 0,01$), были выявлены значимые связи между уровнем тестостерона и толщиной базальной мембраны ($r = 0,89$; $p < 0,01$) и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,87$; $p < 0,01$). Была выявлена сильная положительная корреляционная связь между уровнем лютеинизирующего гормона с толщиной базальной мембраны ($r = 0,93$; $p < 0,01$) и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,89$; $p < 0,01$). Высокая отрицательная корреляционная связь наблюдалась между уровнем фолликулостимулирующего гормона и количеством сперматозоидов ($r = -0,73$; $p < 0,01$), в остальных случаях наблюдались средние положительные и отрицательные корреляционные связи.

Во второй экспериментальной группе на 14-е сутки количество высоких положительных корреляционных связей между показателями семенников и уровнем гормонов было выше, чем в первой экспериментальной группе в аналогичные сроки исследования. А именно: между массой семенника и толщиной сперматогенного эпителия, между толщиной сперматогенного эпителия и следующими показателями: количеством сперматогоний ($r = 0,89$; $p < 0,01$), количеством сперматоцитов ($r = 0,84$; $p < 0,01$), числом сперматид ($r = 0,89$; $p < 0,01$) и сперматозоидов ($r = 0,79$; $p < 0,01$). Высокая корреляционная связь наблюдалась между уровнем тестостерона и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,71$; $p < 0,01$). Между показателем уровня фолликулостимулирующего гормона выявлены высокие положительные корреляционные связи со следующими показателями: количеством сперматогоний ($r = 0,96$; $p < 0,01$), количеством сперматоцитов ($r = 0,94$; $p < 0,01$), числом сперматид ($r = 0,96$; $p < 0,01$) и сперматозоидов ($r = 0,89$; $p < 0,01$). В

остальных случаях наблюдались средние положительные и отрицательные корреляционные связи.

На 21-е сутки в первой экспериментальной группе отмечается устойчивое сохранение положительной корреляции массы семенников с такими параметрами как: толщина базальной мембраны ($r = 0,91$; $p < 0,01$), толщина сперматогенного эпителия ($r = 0,93$; $p < 0,01$); показателя уровня тестостерона с аналогичными показателями – толщиной базальной мембраны ($r = 0,89$; $p < 0,01$), толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,97$; $p < 0,01$). Остальные показатели характеризовались умеренными либо слабыми положительными и отрицательными связями.

Во второй экспериментальной группе сильные положительные корреляционные связи наблюдались между массой семенника и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,87$; $p < 0,01$). Кроме того, сильные положительные корреляционные связи были отмечены между уровнем тестостерона и площадью канальцев ($r = 0,84$; $p < 0,01$), толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,84$; $p < 0,01$). Помимо указанных зависимостей, была выявлена значимая отрицательная корреляция между концентрацией лютеинизирующего гормона и толщиной сперматогенного эпителия ($r = -0,75$; $p < 0,01$).

По истечении 35-х суток исследования в первой экспериментальной группе выявлено наличие выраженной положительной корреляционной связи между массой семенников и толщиной базальной мембраны ($r = 0,87$; $p < 0,01$), толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,87$; $p < 0,01$), а также уровень тестостерона коррелировал с аналогичными показателями – толщиной базальной мембраны ($r = 0,87$; $p < 0,01$), толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,88$; $p < 0,01$). Между уровнем фолликулостимулирующего гормона и числом сперматозидов ($r = 0,89$; $p < 0,01$). Выраженные отрицательные корреляционные связи отмечались между уровнем лютеинизирующего гормона и толщиной базальной мембраны ($r = -0,93$; $p < 0,01$), толщиной сперматогенного эпителия

($r = -0,83$; $p < 0,01$). В остальных случаях наблюдались умеренные положительные и отрицательные корреляционные связи.

Во второй экспериментальной группе сильные связи наблюдались лишь в двух случаях, а именно между массой семенника и толщиной сперматогенного эпителия ($r = 0,82$; $p < 0,01$), а также между уровнем лютеинизирующего гормона и толщиной базальной мембраны ($r = 0,84$; $p < 0,01$). В остальных случаях наблюдались умеренные положительные и отрицательные корреляционные связи.

Резюме. При терапии отмечается усиление корреляционных связей между морфологическими параметрами семенников и гормональным профилем, особенно с тестостероном и ЛГ. Добавление дигидрокверцетина приводило к снижению количества корреляций к поздним срокам, что может указывать на его модулирующее влияние на восстановление тканей и гормональный баланс. Наиболее устойчивые связи наблюдались между массой семенника, толщиной сперматогенного эпителия и уровнем тестостерона.

Таблица 16 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 7-е сутки после 1-го курса ПХТ

Показатели	Площадь канальца	Толщина базальной мембраны	Толщина сперматогенного эпителия	Кол-во клеток Лейдига	Кол-во клеток Сертоли	Кол-во сперматогоний	Кол-во сперматоцит	Кол-во сперматид	Кол-во сперматозоидов
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Масса семенника	$r = -0,43$ $p < 0,01$	$r = 0,96$ $p < 0,01$	$r = 0,97$ $p < 0,01$	$r = 0,13$ $p < 0,01$	$r = -0,27$ $p < 0,01$	$r = -0,33$ $p < 0,01$	$r = -0,22$ $p < 0,01$	$r = -0,3$ $p < 0,01$	$r = 0,31$ $p < 0,01$
Толщина белочной оболочки	$r = -0,13$ $p < 0,01$	$r = -0,46$ $p < 0,01$	$r = -0,52$ $p < 0,01$	$r = 0,3$ $p < 0,01$	$r = 0,65$ $p < 0,01$	$r = 0,4$ $p < 0,01$	$r = 0,03$ $p < 0,01$	$r = 0,29$ $p < 0,01$	$r = -0,26$ $p < 0,01$
Уровень тестостерона	$r = -0,58$ $p < 0,01$	$r = 0,95$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = -0,31$ $p < 0,01$	$r = -0,23$ $p < 0,01$	$r = -0,48$ $p < 0,01$	$r = -0,23$ $p < 0,01$	$r = -0,52$ $p < 0,01$	$r = 0,25$ $p < 0,01$
Уровень ЛГ	$r = 0,47$ $p < 0,01$	$r = 0,91$ $p < 0,01$	$r = 0,95$ $p < 0,01$	$r = -0,24$ $p < 0,01$	$r = -0,24$ $p < 0,01$	$r = -0,25$ $p < 0,01$	$r = -0,04$ $p < 0,01$	$r = -0,19$ $p < 0,01$	$r = 0,27$ $p < 0,01$

Таблица 17 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 7-е сутки после 1-го курса ПХТ + ДГК

[illegible]

Таблица 18 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 14-е сутки после 2-го курса ПХТ

Показатели	Площадь канальца	Толщина базальной мембраны	Толщина сперматогенного эпителия	Кол-во клеток Лейдига	Кол-во клеток Сертоли	Кол-во сперматогоний	Кол-во сперматоцит	Кол-во сперматид	Кол-во сперматозоидов
Масса семенника	$r = -0,33$ $p < 0,01$	$r = 0,94$ $p < 0,01$	$r = 0,82$ $p < 0,01$	$r = -0,57$ $p < 0,01$	$r = -0,27$ $p < 0,01$	$r = -0,2$ $p < 0,01$	$r = -0,19$ $p < 0,01$	$r = -0,01$ $p < 0,01$	$r = -0,37$ $p < 0,01$
Толщина белочной оболочки	$r = -0,2$ $p < 0,01$	$r = -0,15$ $p < 0,01$	$r = -0,01$ $p < 0,01$	$r = -0,37$ $p < 0,01$	$r = 0,009$ $p < 0,01$	$r = 0,59$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = 0,27$ $p < 0,01$	$r = -0,47$ $p < 0,01$
Уровень тестостерона	$r = -0,47$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = 0,87$ $p < 0,01$	$r = -0,57$ $p < 0,01$	$r = -0,06$ $p < 0,01$	$r = -0,37$ $p < 0,01$	$r = -0,23$ $p < 0,01$	$r = -0,003$ $p < 0,01$	$r = -0,49$ $p < 0,01$
Уровень ЛГ	$r = -0,4$ $p < 0,01$	$r = 0,93$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = -0,52$ $p < 0,01$	$r = -0,16$ $p < 0,01$	$r = -0,37$ $p < 0,01$	$r = -0,28$ $p < 0,01$	$r = -0,006$ $p < 0,01$	$r = -0,39$ $p < 0,01$
Уровень ФСГ	$r = 0,12$ $p < 0,01$	$r = 0,03$ $p < 0,01$	$r = -0,08$ $p < 0,01$	$r = -0,34$ $p < 0,01$	$r = -0,2$ $p < 0,01$	$r = 0,26$ $p < 0,01$	$r = 0,62$ $p < 0,01$	$r = 0,15$ $p < 0,01$	$r = -0,73$ $p < 0,01$
Примечание: r – коэффициент корреляции, p – достоверность различия.									

Таблица 19 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 14-е сутки после 2-го курса ПХТ + ДГК

Показатели	Площадь канальца	Толщина базальной мембраны	Толщина сперматогенного эпителия	Кол-во клеток Лейдига	Кол-во клеток Сертоли	Кол-во сперматогоний	Кол-во сперматоцит	Кол-во сперматид	Кол-во сперматозоидов
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Масса семенника	$r = 0,51$ $p < 0,01$	$r = 0,61$ $p < 0,01$	$r = 0,91$ $p < 0,01$	$r = 0,19$ $p < 0,01$	$r = -0,12$ $p < 0,01$	$r = -0,32$ $p < 0,01$	$r = -0,43$ $p < 0,01$	$r = -0,32$ $p < 0,01$	$r = -0,63$ $p < 0,01$
Толщина белочной оболочки	$r = -0,04$ $p < 0,01$	$r = -0,03$ $p < 0,01$	$r = -0,17$ $p < 0,01$	$r = -0,17$ $p < 0,01$	$r = 0,11$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = 0,84$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = 0,79$ $p < 0,01$

Таблица 20 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 21-е сутки после 2-го курса ПХТ

Показатели	Площадь канальца	Толщина базальной мембраны	Толщина сперматогенного эпителия	Кол-во клеток Лейдига	Кол-во клеток Сертоли	Кол-во сперматоцитов	Кол-во сперматовидных элементов	Кол-во сперматозоидов	% нормальных форм
Масса семенника	r = 0,27 p < 0,01	r = 0,91 p < 0,01	r = 0,93 p < 0,01	r = 0,31 p < 0,01	r = -0,16 p < 0,01	r = -0,04 p < 0,01	r = 0,28 p < 0,01	r = -0,04 p < 0,01	r = 0,13 p < 0,01
Толщина белочной оболочки	r = -0,04 p < 0,01	r = -0,33 p < 0,01	r = -0,41 p < 0,01	r = -0,23 p < 0,01	r = 0,65 p < 0,01	r = 0,77 p < 0,01	r = 0,37 p < 0,01	r = 0,77 p < 0,01	r = 0,65 p < 0,01
Уровень тестостерона	r = 0,31 p < 0,01	r = 0,89 p < 0,01	r = 0,97 p < 0,01	r = 0,27 p < 0,01	r = -0,26 p < 0,01	r = -0,23 p < 0,01	r = 0,11 p < 0,01	r = -0,05 p < 0,01	r = -0,06 p < 0,01
Уровень ЛГ	r = -0,13 p < 0,01	r = -0,75 p < 0,01	r = -0,62 p < 0,01	r = 0,27 p < 0,01	r = 0,66 p < 0,01	r = 0,53 p < 0,01	r = 0,28 p < 0,01	r = 0,12 p < 0,01	r = 0,32 p < 0,01
Уровень ФСГ	r = -0,001 p < 0,01	r = -0,21 p < 0,01	r = -0,24 p < 0,01	r = -0,54 p < 0,01	r = 0,07 p < 0,01	r = 0,59 p < 0,01	r = 0,63 p < 0,01	r = 0,76 p < 0,01	r = 0,71 p < 0,01

Примечание: r – коэффициент корреляции, p – достоверность различия.

Таблица 21 – Корреляционные связи между показателями семенника на 21-е сутки после 2-го курса ПХТ + ДГК

Показатели	Площадь канала	Толщина базальной мембраны	Толщина сперматогенного эпителия	Кол-во клеток Лейдига	Кол-во клеток Сертоли	Кол-во сперматогоний	Кол-во сперматоцит	Кол-во сперматид	Кол-во сперматозоидов
Масса семенника	$r = -0,19$ $p < 0,01$	$r = 0,56$ $p < 0,01$	$r = 0,87$ $p < 0,01$	$r = -0,22$ $p < 0,01$	$r = -0,12$ $p < 0,01$	$r = -0,18$ $p < 0,01$	$r = -0,64$ $p < 0,01$	$r = -0,49$ $p < 0,01$	$r = -0,41$ $p < 0,01$
Толщина белочной оболочки	$r = -0,12$ $p < 0,01$	$r = -0,003$ $p < 0,01$	$r = -0,12$ $p < 0,01$	$r = 0,25$ $p < 0,01$	$r = 0,16$ $p < 0,01$	$r = 0,09$ $p < 0,01$	$r = 0,26$ $p < 0,01$	$r = 0,31$ $p < 0,01$	$r = 0,03$ $p < 0,01$
Уровень тестостерона	$r = 0,84$ $p < 0,01$	$r = 0,54$ $p < 0,01$	$r = 0,89$ $p < 0,01$	$r = -0,07$ $p < 0,01$	$r = -0,23$ $p < 0,01$	$r = -0,06$ $p < 0,01$	$r = -0,44$ $p < 0,01$	$r = -0,29$ $p < 0,01$	$r = -0,2$ $p < 0,01$
Уровень ЛГ	$r = 0,49$ $p < 0,01$	$r = -0,45$ $p < 0,01$	$r = -0,75$ $p < 0,01$	$r = 0,008$ $p < 0,01$	$r = 0,17$ $p < 0,01$	$r = 0,003$ $p < 0,01$	$r = 0,38$ $p < 0,01$	$r = 0,24$ $p < 0,01$	$r = 0,1$ $p < 0,01$
Уровень ФСГ	$r = -0,47$ $p < 0,01$	$r = 0,43$ $p < 0,01$	$r = -0,32$ $p < 0,01$	$r = 0,09$ $p < 0,01$	$r = 0,21$ $p < 0,01$	$r = 0,83$ $p < 0,01$	$r = 0,54$ $p < 0,01$	$r = 0,53$ $p < 0,01$	$r = 0,56$ $p < 0,01$
Примечание: r – коэффициент корреляции, p – достоверность различия.									

Таблица 22 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 35-е сутки после 2-го курса ПХТ

Показатели	Площадь канала	Толщина базальной мембраны	Толщина сперматогенного эпителия	Кол-во клеток Лейдига	Кол-во клеток Сертоли	Кол-во сперматогоний	Кол-во сперматоцит	Кол-во сперматид	Кол-во сперматозоидов
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Масса семенника	$r = 0,33$ $p < 0,01$	$r = 0,87$ $p < 0,01$	$r = 0,87$ $p < 0,01$	$r = -0,39$ $p < 0,01$	$r = -0,23$ $p < 0,01$	$r = -0,16$ $p < 0,01$	$r = -0,2$ $p < 0,01$	$r = -0,12$ $p < 0,01$	$r = 0,003$ $p < 0,01$
Толщина белочной оболочки	$r = 0,44$ $p < 0,01$	$r = 0,27$ $p < 0,01$	$r = 0,35$ $p < 0,01$	$r = -0,26$ $p < 0,01$	$r = 0,29$ $p < 0,01$	$r = 0,4$ $p < 0,01$	$r = 0,05$ $p < 0,01$	$r = 0,2$ $p < 0,01$	$r = 0,38$ $p < 0,01$

Таблица 23 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 35-е сутки после 2-го курса ПХТ + ДГК

[illegible]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема влияния агрессивных факторов внешней среды на мужскую репродуктивную систему является весьма актуальной проблемой ввиду высокой чувствительности половых желез к токсическим воздействиям [6; 13; 125; 191]. Установлено, что среди многочисленных агентов значительную гонадотоксичность оказывает противоопухолевая химиотерапия [114; 168; 219].

Наблюдаемый рост распространенности онкологических заболеваний среди людей молодого возраста, особенно подчеркивает необходимость углубленного изучения способов минимизации побочных эффектов противоопухолевой терапии и разработки мер профилактики индуцированного ею бесплодия. Прогресс в области диагностики и терапии злокачественных новообразований позволил инициировать лечение на ранних стадиях заболевания и существенно снизить показатели смертности от онкопатологии [45; 53]. Тем не менее, несмотря на достигнутые успехи, используемые в настоящее время противоопухолевые препараты характеризуются высоким уровнем токсичности, поскольку их влияние распространяется не только на очаги малигнизации, но и на интактные ткани организма, что способствует формированию полиорганной дисфункции [32; 33]. Среди желез внутренней секреции наибольшую чувствительность к воздействию цитостатиков имеют семенники [224].

Значительное число исследований посвящено оценке морфофункционального статуса семенников лабораторных крыс после завершения курса противоопухолевой терапии [114; 124; 200; 217]. Вместе с тем, отсутствуют публикации, всесторонне освещающие патоморфологические изменения в половых железах, подходы к профилактике нарушений фертильной функции, а также характер корреляционных связей между структурами тестикул и гормональным статусом при проведении двух последовательных курсов терапии на различных временных этапах – спустя 21 и 35 суток после окончания последнего цикла лечения.

Настоящее исследование направлено на комплексное изучение патоморфологических изменений в семенниках лабораторных животных, разработку методов уменьшения токсического эффекта противоопухолевой терапии, выявление корреляционной взаимосвязи между структурными компонентами органов репродуктивной системы после двукратного курса полихимиотерапии, а также на последующих этапах наблюдения – на 21-е и 35-е сутки после завершения терапии.

При исследовании семенников крыс на 7-е сутки после первого курса противоопухолевой терапии в первой экспериментальной группе наблюдалось снижение массы, объема и размеров по отношению к контролю. Добавление дигидрокверцетина способствовало частичной компенсации цитостатической токсичности, однако статистически значимые различия показателей с первой экспериментальной группой отсутствовали. Макроскопически половые железы были овальной, несколько сплюсненной с боков формы, серовато-красного цвета, с полнокровными сосудами. Ткань семенников от серовато-розового, до серо-бордового цвета.

В экспериментальном исследовании с использованием комплекса препаратов, входящих в протокол СНОР, при микроскопическом исследовании в обеих экспериментальных группах наблюдались однотипные изменения: утолщение белочной оболочки, усиление кровенаполнения и развитие отека органа. После повторного курса на 14-е сутки отек становился более выраженным, происходила гиалинизация коллагеновых волокон и разрушение эластического слоя, причем показатели толщины капсулы в первой экспериментальной группе существенно превышают аналогичные значения у животных, получавших антиоксидант.

Доказано, что сосуды остро реагируют на действие токсических агентов. У животных экспериментальных групп сосуды микроциркуляторного русла были расширены, полнокровны, в ряде случаев сосудистая стенка подвергалась разволокнению, встречались сосуды с нарушением проницаемости стенки с выходом клеточных элементов в окружающие ткани, отмечались явления стаза и

сладж-синдрома, интенсивность которого зависела от дозы введённых препаратов. Согласно данным полученных исследований гипоксия способствовала нарушениям структурных элементов тестикулярной ткани [223; 227; 233].

Структура сперматогенного эпителия была резко нарушена. В первой экспериментальной группе наблюдалось статистически значимое уменьшение толщины сперматогенного эпителия в 2,09 раза по сравнению с показателями контрольной группы. Во второй экспериментальной группе применение дигидрохверцетина позволило уменьшить токсическое влияние противоопухолевой терапии, следствием чего стало снижение толщины сперматогенного эпителия относительно контроля в 1,42 раза и относительно первой экспериментальной группы в 1,46 раза.

Выявлялась резкая деструкция сперматогенного эпителия. Уже после первого курса отмечалось уменьшение числа практически всех форм зародышевых клеток, в некоторых канальцах отмечалось беспорядочное расположение клеток половых клеток с утратой четкости границ и нормальной ориентации. Десквамированные клетки сперматогенного эпителия утрачивали нормальную структуру: цитоплазма становилась слабо окрашенной, приобретала признаки вакуолизации. Ядерные элементы таких клеток подвергались резкой конденсации хроматина, иногда представляя собой плотные, интенсивно окрашивающиеся фрагменты. Просвет большинства семенных канальцев содержал редкие, отдельные экземпляры повреждённых сперматозоидов.

Выявленные нарушения структуры сперматогенного эпителия коррелировали с повышением объемов вводимых химиопрепаратов. После повторного курса химиотерапии наблюдалось резкое возрастание доли половых клеток, претерпевших дегенеративные изменения: проявлялась характерная вакуолизация и гранулированное набухание цитоплазмы. Одновременно просвет большинства семенных канальцев характеризовался заметным дефицитом одного или нескольких слоев зародышевых клеток. Сперматогенный эпителий терял компактность, его клетки располагались рыхло, переставая плотно примыкать

друг к другу. Полученные нами данные не противоречили результатам предыдущих исследований [183; 219; 230].

Сперматогонии в изучаемых образцах представлены округлыми либо полигональными формами, заполненными значительным количеством гранул. В отдельных клетках обнаруживались признаки вакуольной дистрофии, вакуоли были округлой формы, различного размера. По сравнению с группой контроля в первой экспериментальной группе установлено резкое сокращение количества сперматогоний, данные изменения носили статистически значимую достоверность по сравнению как с группой контроля, так и со второй экспериментальной группой с добавлением дигидрохверцетина. Анализируя обе экспериментальные группы после повторных курсов терапии, отмечено учащённое возникновение феномена опустошённых семенных канальцев («синдром клеток Сертоли») [228; 230].

Схожие результаты наблюдались при изучении структурно-функциональных нарушений в эндокринных и иммунных органах пациентов с лекарственно устойчивым туберкулезом лёгких [36]. Похожая ситуация зафиксирована и при применении селективных ингибиторов обратного захвата серотонина [179]. Согласно работам Renato de Franca L. и коллег, высокая доля канальцевого компонента непосредственно влияет на продукцию достаточного количества сперматозоидов [136].

Согласно полученным данным, несмотря на относительную количественную устойчивость клеток Сертоли к токсическому действию противоопухолевых препаратов, в первой экспериментальной группе отмечались качественные изменения клеток Сертоли, проявляющиеся их дистрофией: ядра сустентоцитов имели неровные контуры, вытянутую уплощенную форму; объем ядер и процент этих клеток со светлыми ядрами достоверно снижался по сравнению к аналогичным показателям групп контроля и второй экспериментальной группы.

При гистологическом исследовании эндокринного аппарата семенников экспериментальных животных интерстициальные островки в ряде случаев

определялись с затруднением из-за выраженного отека и диффузного разрастания соединительной ткани. Наблюдаемые интерстициальные островки были представлены преимущественно средними и малыми эндокриноцитами, с преобладанием последних. Нарушение трофики органа приводило к сдавлению цитоплазмы эндокриноцитов, в результате чего клетки Лейдига средних размеров зачастую были представлены как сморщенные клетки, с ядром неправильной формы, с хроматином, имеющим глыбчатое расположение. Малые клетки были представлены в основном инволюционирующими элементами с большим количеством зерен и глыбок пигмента в цитоплазме. Соотношение морфофункциональных типов эндокриноцитов в обеих группах изменялось в сторону преобладания инволюционирующих малых форм. После повторного курса противоопухолевых препаратов преобладание малых форм эндокриноцитов увеличилось в обеих экспериментальных группах. В научной литературе встречаются упоминания о схожей картине [108; 148; 118].

У крыс первой экспериментальной группы после завершения первого курса химиотерапии были зафиксированы незначительные регрессивные изменения диаметра клеточных ядер и объема клетки, сопровождающиеся сокращением общей численности клеток Лейдига и достоверным снижением показателя функциональной активности. Отмечено также, что морфофункциональные характеристики эндокринных клеток во второй экспериментальной группе оказались менее выраженными относительно первой группы. Повторное введение антибластомных препаратов вызвало схожий эффект – снижение числа зрелых форм эндокринных клеток и рост доли инволютивных форм, сопряжённый со значительным падением концентрации тестостерона у всех экспериментальных животных. Согласно литературным данным, последнее обстоятельство закономерно приводило к развитию адаптивной реакции организма, проявившейся компенсаторной активацией гипофизарной секреции лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов [187].

Проведённое иммуногистохимическое исследование свидетельствовало о глубоком подавлении пролиферативной активности клеток сперматогенного

эпителия, вызванном применением противоопухолевых препаратов. Показано значительное снижение уровня экспрессии маркера Ki-67, как после первого, так и после повторного курса химиотерапии. Одновременно отмечалось повышение уровней белков p53 и Caspase-3, являющихся показателями апоптоза, что подтверждает усиление процессов программируемой клеточной гибели. Значительно уменьшалось число клеток, экспрессирующих маркер CD117, что отражает нарушенный процесс дифференцировки стволовых сперматогоний. Полученные данные показывают выраженную зависимость изменений в семенниках от применяемой химиотерапии, характеризующуюся снижением пролиферативной активности и увеличением количества клеток, вовлечённых в апоптоз. Добавление антиоксиданта-дигидрохверцетина, как мы считаем, приводило к снижению токсического действия противоопухолевой терапии.

Изучение эпидидимальной суспензии выявило значительное влияние схемы СНОР на морфофункциональное состояние сперматозоидов. Показатели общего числа сперматозоидов в обеих экспериментальных группах были статистически ниже по сравнению с контролем, особенно заметно это было после первого курса противоопухолевой терапии, когда количество сперматозоидов в обеих экспериментальных группах снижалось на 42 %. После повторного курса разница между первой экспериментальной группой и контрольной составила 45 %, в группе с применением антиоксиданта количество сперматозоидов по-прежнему оставалось на отметке 42 %, что, как мы считаем, могло свидетельствовать о снижении токсического действия химиотерапии антиоксидантом дигидрохверцетином. В особенности протективное действие дигидрохверцетина было хорошо заметно в достоверном снижении количества патологических форм сперматозоидов в сравнении с первой экспериментальной группой. Резкое увеличение количества патологических форм сперматозоидов нашло отражение в уменьшении фертильных форм сперматозоидов и резком увеличении не фертильных форм. После повторного введения курса противоопухолевых препаратов тенденция к увеличению не фертильных форм сохранялась.

Данные, полученные при изучении семенников крыс после двукратного введения комплекса противоопухолевых препаратов, свидетельствуют о высокой чувствительности сперматогенного эпителия к токсическому воздействию цитостатиков, зависимости функциональной активности клеток Лейдига от объема вводимых препаратов. Сперматозоиды уязвимы перед воздействием противоопухолевых препаратов, что выражается увеличением количества патологических форм, снижением количества фертильных сперматозоидов и снижением их жизнеспособности. Дополнительно подтверждено, что включение дигидрокверцетина в терапевтический режим эффективно снижает токсическое влияние цитостатиков на организм. Комплекс препаратов СНОР оказывает сильное токсическое действие на морфофункциональное состояние семенников крыс экспериментальных групп.

На 21–35-е сутки после окончания химиотерапии восстанавливаются отдельные физиологические показатели, однако они остаются достоверно ниже, чем показатели контрольной группы, демонстрируя долгосрочный негативный эффект противоопухолевых препаратов.

Через 21 и 35 суток после химиотерапии происходит частичное восстановление показателей массы тела и семенников, однако они остаются достоверно ниже соответствующих значений контрольной группы. Введение дигидрокверцетина позволяет приблизить эти показатели к контрольной группе, особенно в отношении массы тела. Тем не менее, объем и морфологические характеристики семенников сохраняют признаки дистрофических изменений, что свидетельствует о длительном периоде восстановления репродуктивной функции.

При гистологическом исследовании семенников крыс экспериментальных групп было выявлено отсутствие значимых количественных изменений сосудов, однако наблюдались морфологические изменения в сосудистой стенке, наиболее выраженные на 21-е сутки исследования. Характеристика сосудистых нарушений включала в себя накопление гликозаминогликанов с образованием гиалина, что в свою очередь способствовало развитию склеротических процессов. Полученные

нами данные согласовались с ранее проведенными исследованиями A. R. Tremblay и G. Delbes [230].

С 21-х суток исследования наблюдались существенные изменения в стромально-паренхиматозном соотношении, обусловленные увеличением площади паренхимы, однако коэффициент в обеих экспериментальных группах оставался ниже, чем в контрольной группе. На 35-е сутки исследования сохранялись нарушения гематотестикулярного барьера, сопровождающиеся дистрофическими изменениями сперматогенного эпителия, однако выраженность их была ниже, чем на ранних этапах исследования. Применение антиоксиданта частично снижало токсическое действие цитостатиков, таким образом, средний размер и площадь семенных канальцев у животных данной группы выше, чем аналогичный показатель из первой экспериментальной группы.

С 21-х суток наблюдалась положительная динамика увеличения толщины сперматогенного эпителия в обеих экспериментальных группах на 6,39 % в первой и на 7,59 % во второй. Данный прирост сопровождался тенденцией к увеличению количества сперматогенных клеток, однако в ряде случаев сохранялись выраженные морфологические нарушения, такие как «синдром клеток Сертоли» и присутствие дистрофически измененных половых клеток (вакуольная дистрофия, зернистое набухание цитоплазмы). На 35-е сутки исследования сохранялась тенденция к увеличению толщины сперматогенного эпителия, но при этом сохранялось значительное количество дефектных клеток, не способных полноценно формировать зрелые сперматозоиды. Во второй экспериментальной группе значение дефектных клеток было достоверно ниже, чем в первой экспериментальной группе, но оставалось выше, чем в контрольной группе.

При иммуноферментном анализе половых гормонов удалось выявить ряд значимых закономерностей в динамике гормонального статуса и состоянии сперматогенного эпителия после применения комплекса противоопухолевых препаратов. На 21-е сутки отмечалось незначительное, но статистически значимое увеличение уровня тестостерона в обеих экспериментальных группах, что, как мы

считаем, подтверждает запуск компенсаторных механизмов восстановления репродуктивной функции. Важно отметить, что, несмотря на данное увеличение, концентрация тестостерона оставалась достоверно ниже контрольных значений, что свидетельствовало о серьезном дефиците выработки полового гормона спустя 21 сутки после применения комплекса химиопрепаратов.

По истечении 35 суток динамика изменений продолжала носить положительный характер, однако уровень тестостерона по-прежнему оставался существенно ниже контрольных значений, подтверждая хроническую природу нарушений регуляции выработки андрогенов. Особенностью рассматриваемого периода стало сопоставимое повышение уровня тестостерона в обеих экспериментальных группах, однако разница в степени отклонения от нормального уровня составляла 11,38 %, что подчеркивает индивидуальные особенности реагирования животных на терапевтические вмешательства, описанные в литературных источниках [78; 151].

Отдельно следует обратить внимание на изменение уровня лютеинизирующего гормона, который, напротив, показал тенденцию к снижению, вероятно, отражая начавшийся процесс восстановления нормальной регуляции гипоталамо-гипофизарной оси. Фолликулостимулирующий гормон, играющий ключевую роль в сперматогенезе, также начал нормализоваться, способствуя восстановлению структур сперматогенного эпителия.

Эти данные позволяют сделать вывод о том, что комплекс противоопухолевых препаратов оказывает сильное негативное воздействие на эндокринную регуляцию репродуктивной системы, вызывая стойкую дисфункцию производства тестостерона и связанных с ним гормонов. Параллельно развивается компенсаторная реакция организма, направленная на восстановление утраченных функций, однако данная реакция оказывается недостаточно эффективной для полного возвращения к нормальным физиологическим показателям.

При гистологическом исследовании эндокринного аппарата семенников были выявлены следующие изменения: утолщение белочной оболочки,

полнокровие, отек стромы и стенок кровеносных сосудов, отек интерстициальных островков с диффузным разрастанием соединительной ткани, а также дистрофические изменения в эндокриноцитах, включая накопления липофусцина и изменение структуры ядер клеток Лейдига. Изменения количественного состава клеток Лейдига характеризовались уменьшением числа мелких форм и увеличением крупных форм эндокриноцитов, особенно это было заметно на 35-е сутки наблюдения. Морфометрический анализ выявил повышение объёма клеток и диаметров их ядер, сопровождавшееся увеличением индекса активности клеток Лейдига и повышением уровня тестостерона в крови. Полученные данные свидетельствуют о развитии адаптивных процессов в эндокринном аппарате семенников, направленных на восстановление гормональной функции в условиях развившегося патологического процесса. Однако полное восстановление морфологических характеристик и функций клеточных элементов остается неполным даже спустя месяц эксперимента.

Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности с использованием маркера Ki-67 позволило выявить следующие закономерности: введение химиотерапевтических препаратов вызвало длительное угнетение пролиферативной активности сперматогоний. Через 21 сутки после химиотерапии индекс пролиферации в среднем достоверно сократился вдвое по сравнению с контрольными значениями. К 35-м суткам наблюдения начиналось восстановление пролиферативной активности, однако оно оставалось недостаточным для полного возврата к первоначальным показателям. Тем не менее, указанные значения превышали уровни, зарегистрированные на 21-е сутки. Клетки Сертоли, Лейдига и миоциты практически не демонстрировали реакцию на маркер Ki-67, что подтверждает избирательность действия химиопрепаратов преимущественно на сперматогенную линию. Отмечалось повышение экспрессии белка p53 в сперматогониях обеих экспериментальных групп на 21-е сутки после химиотерапии. Этот рост свидетельствует о наличии повышенного уровня апоптотических сигналов в сперматогенном эпителии, индуцированного воздействием химиопрепаратов. Спустя две недели после пика активации p53

(35-е сутки), начинается постепенное снижение экспрессии p53, что отражает переход к этапу репарации и адаптации тканей. Анализ активности caspase-3 подтвердил участие путей программируемой клеточной смерти в раннем периоде после химиотерапии. Хотя общий уровень caspase-3 немного снизился к 21-м суткам, этот эффект оставался значительным на 35-е сутки. На 21-е сутки исследования отмечено умеренное повышение экспрессии CD117 в сперматогониях обеих экспериментальных групп. Увеличение экспрессии CD117 зафиксировано и на 35-й день. Повышение экспрессии CD117 коррелирует с развитием компенсаторного процесса в ответ на стрессовые факторы, вероятно, стимулирующего формирование нового поколения сперматогоний и возобновления нормального сперматогенеза.

Отсутствие положительной реакции на Ki-67, p53 и caspase-3 в клетках Сертоли, Лейдига и миоцитах подтверждает селективность негативного эффекта противоопухолевых препаратов преимущественно на сперматогенный эпителий. Данные результаты указывают на высокую чувствительность спермиогенеза к применяемым химиотерапевтическим препаратам и требуют дополнительного изучения долгосрочного восстановления пролиферативного потенциала семенников после прекращения терапии. Так же полученные данные свидетельствуют о защитно-компенсаторной роли дигидрокверцетина в восстановлении сперматогенного эпителиального слоя после повреждений, вызванных различными факторами стресса, такими как химиотерапия.

В обеих экспериментальных группах количество сперматозоидов увеличивается в сравнении с показателями на 14-е сутки, но остается достоверно ниже, чем аналогичный показатель контрольной группы. Несмотря на меньшее количество сперматозоидов в экспериментальных группах, отмечалось увеличение патологических форм сперматозоидов: аморфность головок, нарушение размеров головок, отсутствие хвоста, удвоение головы, укороченность и спирализация хвоста, что коррелировало с уменьшением фертильных форм сперматозоидов, полученные данные согласовались с ранее опубликованным исследованием [106].

Таким образом, морфометрические, иммуноферментные, гистохимические и цитологические исследования, а также проведенный корреляционный анализ позволили выявить морфофункциональные изменения семенников в экспериментальных группах при различных объемах вводимых противоопухолевых препаратов и подтвердить наличие межструктурной корреляции между тканевыми компонентами. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов возникновения постхимиотерапевтического бесплодия, вызванного использованием комплексов препаратов типа СНОР, и открывают перспективы для его коррекции, посредством приема дигидрокверцетина.

ВЫВОДЫ

1. Применение препаратов, входящих в протокол СНОР, у животных 1-й и 2-й экспериментальных групп приводит к снижению массы семенников на 17,92 % и 12,02 % ($p < 0,01$) относительно группы контроля, увеличению стромально-паренхиматозного соотношения на 14,28 % и 7,14 %. Повторное применение комплекса химиопрепаратов усиливает данные нарушения, максимально выраженные на 14-е сутки эксперимента и достоверно сохраняющиеся на 21-е и 35-е сутки исследования.

2. Применение стандартизированных препаратов, входящих в протокол СНОР, у животных 1-й и 2-й экспериментальных групп приводит к повреждению гематотестикулярного барьера, уменьшению толщины сперматогенного эпителия на 52,23 % и 30,03 % ($p < 0,01$) относительно группы контроля. Повторное применение химиопрепаратов сопровождалось резким снижением числа сперматозоидов в 1-й группе на 42,59 % и на 37,58 % во 2-й ($p < 0,01$), сперматид на 56,1 % и 51,68 % ($p < 0,01$) и сперматозоидов на 58,3 % и 64,22 % соответственно ($p < 0,01$). Наиболее выраженные структурно-функциональные изменения определялись на 14-е сутки эксперимента и достоверно сохранялись на 21-е и 35-е сутки исследования.

3. Двукратное введение химиопрепаратов, входящих в протокол СНОР, вызывает глубокие структурные и функциональные нарушения в эндокринном аппарате семенников, сохраняющиеся до 35-х суток. На 7-е сутки эксперимента в обеих экспериментальных группах происходило снижение числа клеток Лейдига на 15,74 % и 11,11 % соответственно ($p < 0,01$), уменьшение доли активных форм эндокриноцитов на 4 % и 6 % соответственно, и развитие признаков клеточной атрофии, усиливающейся на 14-е сутки. Морфологические изменения сопровождалось снижением уровня тестостерона на 52,36 % и 48,62 % ($p < 0,01$) и компенсаторным повышением лютеинизирующего (на 262,03 % и 264,85 %, $p < 0,01$) и фолликулостимулирующего гормонов (на 255,24 % и 186,01 %, $p < 0,01$), что свидетельствует о нарушении гипоталамико-гипофизарно-гонадной регуляции.

4. При цитологическом исследовании эпидидимального содержимого в группах животных с двукратным введением химиопрепаратов, входящих в протокол СНОР, отмечалось снижение общего количества сперматозоидов на 45,71 % и 42,05 % ($p < 0,01$), подвижности и индекса фертильности сперматозоидов на 87,51 % и 70,23 % соответственно ($p < 0,01$). Наибольшее количество патологических форм сперматозоидов определялось на 14-е сутки эксперимента (47,13 млн в 1 мл). Данные изменения сохранялись на 21-е и 35-е сутки исследования.

5. В группах животных, получавших дигидрокверцетин на фоне химиотерапии, определялись наиболее высокие показатели двигательной активности и индекса фертильности сперматозоидов (разница между экспериментальными группами составила 56,55 %, $p < 0,01$), восстановление сперматогенного эпителия (разница между экспериментальными группами составила 22,78 %, $p < 0,01$), нормализация уровня тестостерона (разница между группами составила 11,38 %, $p < 0,01$) и улучшение соотношения лютеинизирующий гормон / фолликулостимулирующий гормон, что свидетельствует о поддержании морфологической и функциональной стабильности эндокринного аппарата семенников.

6. Проведенный корреляционный анализ показал, что у самцов крыс после проведения химиотерапии комплексом препаратов, входящих в протокол СНОР, система взаимодействия между эндокринным аппаратом семенников и сперматогенным эпителием подвергается прогрессирующему повреждению, выражающемуся снижением количества сильных и средних связей, на фоне увеличения слабых корреляционных связей. Наибольшее выражение данные изменения имеют в группе без применения дигидрокверцетина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Материалы данной работы рекомендуется внедрить в учебный процесс кафедры патологической анатомии и применять при преподавании разделов общей патологической анатомии «паренхиматозные дистрофии», «стромально-сосудистые дистрофии», «компенсаторно-приспособительные процессы»; частной патологической анатомии – «болезни половых органов».

2. Результаты проведенных исследований рекомендуется включить в программу курсов судебной медицины при преподавании разделов по токсикологии, а также на кафедрах терапии лечебного и педиатрического факультетов, урологии при изучении вопросов, связанных с причинами мужского бесплодия и нарушениями репродуктивной функции.

3. Полученные в диссертационной работе данные рекомендуется использовать врачам патологоанатомам и судебным медикам для установления патогенеза заболеваний и танатогенеза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМГ	анти-мюллеров гормон
ДГК	дигидрокверцетин
ЛГ	лютеинизирующий гормон
ПНС	периферическая нервная система
ССК	сперматогониальные стволовые клетки
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека
цАМФ-РКА	циклический аденозинмонофосфат-зависимая протеинкиназа
ЦНС	центральная нервная система
ABVD	протокол лечения, включающий адриамицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин
BEF	протокол лечения, включающий блеомицином, этопозидом, цисплатином
BRDT	специфический бромодомен-белок гонад
CHOP	протокол лечения, включающий циклофосфамид, гидроксидоунорубицин, онковинкрестин, преднизолон
FISH	флуоресцентная гибридизация in situ
GLUT1	транспортер глюкозы тип 1
H3K9me	гистон 3, метилированный на лизине 9
LD	летальная доза
LDHC4	лактатдегидрогеназа C4
LHCG	рецепторы лютеинизирующего гормона
MAPK	митоген - активируемая протеинкиназа
MCT1	переносчик монокарбоксилата тип 1
MCT2	переносчик монокарбоксилата тип 2
MOPP-ABV	протокол лечения, включающий мехлорэтамин, онковинкрестин, прокарбазин, преднизолон, адриамицин, блеомицин, винбластин

PI3 K-AKT	фосфоинозитид-3-киназа
P-Mod-s	паракринный и мезенхимальный фактор
WT1	фактор транскрипции развития и дифференцировки клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г. Г. Автандилов. – Москва : Медицина, 1980. – 216 с.
2. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. – Москва : Медицина, 1990. – 384 с.
3. Автандилов, Г. Г. Морфометрия в патологии / Г. Г. Автандилов. – Москва : Медицина, 1973. – 245 с.
4. Автандилов, Г. Г. Окулярная измерительная сетка для цито- и гистостереологических исследований / Г. Г. Автандилов // Архив патологии. – 1972. – Т. 34, №6. – С. 76–77.
5. Автандилов, Г. Г. Основы патологоанатомической практики / Г. Г. Автандилов. – Москва : Медицина, 1994. – 510 с.
6. Агеева, Т. А. Процессы репаративной регенерации в яичниках в условиях курсовой полихимиотерапии в эксперименте / Т. А. Агеева, Н. В. Гвоздева // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2012. – № 4. – С. 18.
7. Алексеев, Ю. Д. Возрастная морфология мужских половых желез / Ю. Д. Алексеев // Судебно-медицинская экспертиза. – 1988. – № 6. – С. 41–43.
8. Алиев, Р. А. Клетки Сертоли: структура, функции и роль в патологических процессах / Р. А. Алиев, М. Н. Волков, Т. В. Горская // Урология и Нефрология. – 2015. – № 1. – С. 32–38.
9. Багиров, И. А. Особенности динамики заболеваемости острым лимфобластным лейкозом у детей и лиц молодого возраста / И. А. Багиров // Вопросы онкологии. – 2019. – № 2. – С. 220–223.
10. Белоусов, К. А. Результаты лечения острого миелобластного лейкоза в реальной клинической практике / К. А. Белоусов, А. К. Голенков, Е. В. Катаева // Альманах клинической медицины. – 2015. – № 41. – С. 66–71.
11. Берестенко, С. В. Взаимодействие цинка и кадмия при заболеваниях мочеполовых органов / С. В. Берестенко, В. П. Стусь // Микроэлементы в медицине. – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 1–12.

12. Василевский, А. В. Механизмы синтеза и транспорта тестостерона в клетках Лейдига и влияние факторов внешней среды / А. В. Василевский, Ю. В. Березов, С. М. Игнатъев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165, № 5. – С. 587–591.
13. Винник, Ю. Ю. Диагностика мужского бесплодия: современное состояние проблемы. Клиническая лекция / Ю. Ю. Винник, В. В. Борисов // Consilium Medicum. – 2017. – № 7. – С. 65–69.
14. Виноградова, Н. А. Роль дигидрокверцетина в предотвращении окислительных повреждений ДНК клеток / Н. А. Виноградова, И. А. Яковлева, В. В. Никоноров // Вопросы медицинской химии. – 2022. – Т. 68, № 4. – С. 412–421.
15. Влияние неоадьювантной химиотерапии на уровень костномозговых клеток-предшественниц В крови больных инвазивной карциномой молочной железы / Е. В. Кайгородова, В. М. Перельмутер., А. С. Орехов [и др.] // Гены и клетки. – 2019. – № 4. – С. 72–76.
16. Волков, А. С. Роль клеток Сертоли в процессе сперматогенеза / А. С. Волков, Н. Г. Пантелеев, Д. И. Иванов // Вестник РУДН. Серия Медицина. – 2017. – № 2. – С. 14–20.
17. Гелашвили, О. А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы / О. А. Гелашвили // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – №4. – С. 125–126.
18. Голивец, Т. П. Анализ мировых и российских тенденций онкологической заболеваемости в XXI веке / Т. П. Голивец, Б. С. Коваленко. – DOI: 10.18413/2313-8955-2015-1-4-79-86. – Текст : электронный // Сетевой журнал «Научный результат». Серия «Медицина и фармация». – 2015. – Т. 1, № 4 (6). – URL: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2015-1-4-79-86>.
19. Григоренко, А. А. Патоморфология яичек при остром отравлении алкоголем / А. А. Григоренко, С. С. Перфильева // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2006. – № 23. – С. 95–97.
20. Григорьева, Д. Д. Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии REDD1 рапамицином в клетках рака молочной железы /

Д. Д. Григорьева, Е. М. Жидкова, Е. С. Лылова // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 1. – С. 42-47.

21. Дигидрокверцетин как антиоксидант / Н. А. Тюкавкина, Ю. А. Колесник, И. А. Руленко [и др.] // Человек и лекарство : сб. тезисов II Российского Национального Конгресса. – Москва, 1995. – С. 295.

22. Дигидрокверцетин как потенциальный иммунонутриент в комплексной терапии COVID 19 / В. В. Татаринов, С. В. Орлова, Е. А. Никитина [и др.] // Медицинский алфавит. – 2021. – № 21. – С. 28–32.

23. Доклиническое токсикологическое изучение диквертина / А. А. Шкаренков, А. А. Белошапко, Ю. Б. Кузнецов [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1998. – № 3. – С. 36–39.

24. Зверев, Ю. Ф. Патофизиология клеток Сертоли при эндокринных нарушениях / Ю. Ф. Зверев, О. П. Попова, В. Е. Тарасов // Российский медицинский журнал. – 2019. – № 1. – С. 23–28.

25. Игнатова, Т. С. Взаимосвязь уровня тестостерона и продукции гонадотропинов гипофизом / Т. С. Игнатова, В. В. Евдокимов, А. В. Новиков // Проблемы эндокринологии. – 2017. – Т. 63, № 5. – С. 43–49.

26. Ингибирование мутагенности местных диол-эпоксидных соединений полициклических ароматических углеводородов фенольными растительными флавоноидами / М. Т. Хуан, А. В. Вуд, Х. Л. Ньюмарк [и др.] // Канцерогенез. – 1983. – Т. 4, № 12. – С. 1631–1637.

27. Карпенко, В. В. Участие тестостерона в формировании отрицательной обратной связи с гипофизом у мышей линии C57BL/6 / В. В. Карпенко, В. А. Морозов, А. М. Петрухин // Участие Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 6. – С. 853–861.

28. Кициева, Е. Д. Применение противоопухолевых препаратов в химиотерапии / Е. Д. Кициева // FORCIPE. – 2021. – № S1. – С. 498.

29. Коррекция гемореологических расстройств при остром инфаркте миокарда у крыс комплексом диквертина и аскорбиновой кислоты / М. Б. Плотников, М. Ю. Маслов, О. И. Алиев [и др.] // Вопросы биологической,

медицинской и фармацевтической химии. – 2000. – № 2. – С. 31–33.

30. Корректирующее влияние дигидрокверцетина на состояние окислительного метаболизма у юношей-спортсменов зимних видов спорта в условиях северного региона / В. И. Корчин, Е. П. Федорова, Т. Я. Корчина [и др.] // Экология человека. – 2023. – Т. 30, № 5. – С. 341–352.

31. Крылов, А. В. Комбинаторные эффекты дигидрокверцетина и кверцетина в модификации воспалительных процессов / А. В. Крылов, О. Н. Кошелева, И. А. Соловьева // Патогенез. – 2021. – Т. 19, № 3. – С. 35–42.

32. Кузнецова, Л. В. Влияние химиотерапии на лёгочную ткань и дыхательную функцию Органы дыхания и пищеварительная система / Л. В. Кузнецова, Н. А. Щербачёва, Н. А. Лихман // Легочная медицина. – 2018. – № 4. – С. 14–19.

33. Легочная токсичность противоопухолевого лечения у детей и подростков с лимфомой Ходжкина / С. А. Кулева, М. Б. Белогурова, С. В. Иванова, Л. И. Мельник // Педиатр. – 2015. – № 4. – С. 135–139.

34. Лилли, Р. Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Д. Лилли. – Москва : Мир, 1969. – 648 с.

35. Логинова, Н. А. Противораковая активность дигидрокверцетина при метастазировании опухоли молочной железы / Н. А. Логинова, Е. С. Попова, А. В. Кузнецов // Архив патологии. – 2023. – Т. 85, № 3. – С. 15–21.

36. Макаров, И. Ю. Структурно-функциональные изменения в аденогипофизе и периферических эндокринных железах у мужчин, умерших от прогрессирующего лекарственно резистентного туберкулеза легких / И. Ю. Макаров // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2006. – № 23. – С. 50–54.

37. Макарова, О. А. Моделируя процесс обратной связи между тестостероном и гонадотропинами гипофиза на примере лабораторных животных / О. А. Макарова, В. А. Соколов, О. А. Сидорова // Нейрохимия. – 2017. – Т. 34, № 2. – С. 115–123.

38. Мартынов, А. С. Антиоксидантная синергия дигидрокверцетина и

ресвератрола в кардиопротекции / А. С. Мартынов, Е. В. Борисова, С. Н. Голубев // Кардиология. – 2022. – Т. 62, № 5. – С. 43–50.

39. Матвеева, Н. В. Синергия дигидрокверцетина и рутина в укреплении сосудистой стенки / Н. В. Матвеева, И. М. Игнатьев, В. А. Тарасов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2020. – Т. 15, № 6. – С. 63–69.

40. Мирошниченко, А. А. Генетические основы строения и функциональной активности клеток Сертоли / А. А. Мирошниченко, А. В. Карпов, С. В. Макаров // Генетика. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 302–309.

41. Морозов, Д. А. Исследование уровней тестостерона в тканях яичка методом масс-спектрометрии / Д. А. Морозов, А. С. Никитин, Я. Р. Маслова // Вопросы медицинской химии. – 2020. – Т. 66, № 2. – С. 158–164.

42. Морфологические особенности эмбриональных клеток Сертоли у человека на начальном этапе дифференцировки пола / В. Г. Кожухарь, М. Ю. Скворцова, Ю. С. Петриченко, Г. Н. Визичканич // Медицина: теория и практика. – 2019. – № 5. – С. 255–256.

43. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08. – Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 38 с.

44. Олейников, В. И. Диагностика локального андрогенного статуса при помощи анализа интерстициальной жидкости яичка / В. И. Олейников, А. В. Лебедев, А. А. Козлов // Медицинская наука и практика. – 2019. – № 1. – С. 43–48.

45. Оптимизация терапии первой линии у пациентов с распространенными стадиями лимфомы Ходжкина: эффективность и токсичность интенсивной схемы ЕАСОРР-14 (опыт ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России) / Е. А. Демина, А. А. Леонтьева, Г. С. Тумян [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2017. – № 4. – С. 443–452.

46. Петрова, Э. В. Регуляция метаболизма клеток Сертоли гормонами гипофиза / Э. В. Петрова, В. В. Кирьянова, Н. Л. Фомина // Эндокринология:

новости, мнения, обучение. – 2022. – № 2. – С. 56–62.

47. Пивторак, В. И. Морфологическая характеристика и особенности ультраструктуры клеток Сертоли при экспериментальном варикоцеле / В. И. Пивторак, А. А. Смиуха // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. – 2013. – № 4. – С. 17–23.

48. Поиск и изучение средств растительного происхождения, обладающих гемореологической активностью / М. Б. Плотников, М. Ю. Маслов, О. И. Алиев [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2000. – № 3. – С. 32–35.

49. Применение дигидрокверцетина в комплексной медицинской реабилитации больных ишемической болезнью сердца на госпитальном и амбулаторно-поликлинических этапах / А. В. Шакула, А. М. Щегольков, В. В. Климко [и др.] // Consilium Medicum. – 2008. – Т. 10, № 12. – С. 44–48.

50. Профилактика алопеции в процессе химиотерапии: от теории к реальной клинической практике / М. А. Лядова, Т. А. Нерсесова, А. А. Журавлева [и др.] // Современная онкология. – 2023. – № 4. – С. 498–503.

51. Пушкарь, Д. Ю. Урология : учебник / под ред. Д. Ю. Пушкаря. – 2-е изд.; перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 472 с.

52. Саржевский, В. О. Изменения желудочно-кишечного тракта при высокодозной химиотерапии и аутологичной трансплантации костного мозга у пациентов с онкогематологическими заболеваниями / В. О. Саржевский, Е. Г. Смирнова, В. Я. Мельниченко // Клиническая онкогематология. – 2014. – № 3. – С. 343–353.

53. Современные подходы к оценке деятельности онкослужбы с внедрением информационных систем и современных медицинских технологий / В. Г. Черенков, А. Б. Петров, Т. В. Чистякова, С. А. Александров // Онкология. Журнал им. П. А. Герцена. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 40–44.

54. Соколов, А. И. Ингибиторная роль дигидрокверцетина в формировании вторичных очагов карциномы желудка / А. И. Соколов, В. В. Иванов, А. А. Степанов // Российский биомедицинский журнал. – 2024. – Т. 34, № 2. – С. 117–124.

55. Сорокин, С. В. Перспективы клинического применения дигидрохверцетина для борьбы с оксидативным стрессом / С. В. Сорокин, А. А. Дементьев, Н. С. Тимофеева // Современные наукоёмкие технологии. – 2025. – Т. 23, № 6. – С. 647–653.

56. Сравнительная характеристика влияния дигидрохверцетина и витамина е на продукты перекисного окисления липидов в крови лабораторных животных при холодовом воздействии / О. Г. Круглова, В. А. Доровских, В. И. Тиханов [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – № 40. – С. 71–73.

57. Терехов, А. В. Дигидрохверцетин как перспективный препарат профилактики оксидативных поражений печени / А. В. Терехов, А. А. Ковальчук, Л. С. Лукина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86, № 3. – С. 214–220.

58. Ухов, Ю. И. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников // Ю. И. Ухов, А. Ф. Астраханцев // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. – № 3. – С. 66–71.

59. Фармакологическая и радиационно-защитная активность некоторых производных гамма-пирона (флаванонов и флавонолов) / Т. Ю. Ильюченко, А. И. Хоменко, Л. М. Фригидова [и др.] // Фармакология и токсикология. – 1975. – Т. 38, № 5. – С. 607–612.

60. ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России : [сайт] – URL: <https://nmicr.ru/nauka/nashi-izdaniya/statisticheskiiy-sbornik/> – Текст : электронный.

61. Федотов, А. Г. Антиоксиданты в комплексной терапии злокачественных новообразований молочной железы / А. Г. Федотов, Н. Н. Баранова, П. В. Морозов // Медицинская наука и практика. – 2020. – № 3.

62. Цветкова, Н. А. Совместное применение дигидрохверцетина и катехинов зелёного чая для повышения антиоксидантной устойчивости клеток / Н. А. Цветкова, Ж. А. Самсонова, И. С. Егорова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27, № 1. – С. 54–61.

63. Церебропротекторные эффекты смеси диквертина и аскорбиновой

кислоты / М. Б. Плотников, С. В. Логвинов, Н. В. Пугаченко [и др.] // Фармакология и токсикология. – 2000. – Т. 130, № 11. – С. 543-547.

64. Широков, В. Н. Эффективность дигидрокверцетина в замедлении распространения мелкоклеточного рака лёгких / В. Н. Широков, Л. А. Колесникова, М. А. Петров // Онкология и радиология. – 2025. – Т. 23, № 1. – С. 54-61.

65. Шульгина, Е. П. Использование дигидрокверцетина для нейтрализации свободнорадикальных реакций в организме / Е. П. Шульгина, М. В. Краснов, А. С. Филиппов. // Успехи современной биологии. – 2024. – Т. 144, № 2. – С. 255–264.

66. Эндогенные и экзогенные факторы, влияющие на мужскую фертильность / Н. А. Литвинова, А. И. Лесников, Т. А. Толочко, А. А. Шмелев // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2021. – № 2. – С. 124–135.

67. A common variant in the promoter region of the LHCGR is associated with low serum testosterone concentrations in young men / U. Ottander, A. M. Andersson, C. Børsting [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2011. – Vol. 96 (3). – P. 512–519.

68. Agbaje, I. M. Influence of paternal age on pregnancy outcome following assisted conception / I. M. Agbaje, D. A. Rogers, N. McClure // Obstetrics & Gynecology. – 2006/ – Vol. 108 (1). – P. 61–67.

69. Allen, E. Studies on cell division in the albino rat / E. Allen // J Morphol. – 2005. – Vol. 10 (9). – P. 565–589.

70. Alterations of spermatogenesis in etoposide-treated rats: A stereological study / F. E. Freitas, F. Cordeiro-mori, E. Sasso-Cerri [et al.] // Interciencia. – 2002. – Vol. 27. – P. 227–235.

71. Alves, M. G. Insulin-like growth factor-I increases glucose uptake through translocation of GLUT3 to plasma membrane in cultured rat Sertoli cells / M. G. Alves, P. Soares-da-Silva, J. E. Cavaco// FEBS Letters. – 2013.

72. Amann, R. P. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male / R. P. Amann, S. S. Howards // J Urol. –

1980. – Vol. 124 (2). – P. 211–215.

73. Amann, R. P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? / R. P. Amann // *J Androl.* – 2008. – Vol. 29. – P. 469–487.

74. Anderson, R. A. Age-related changes in male reproduction and fertility / R. A. Anderson, W. B. Wallace // *Seminars in Reproductive Medicine.* – 2016. – Vol. 34 (1). – P. 43–50.

75. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice / R. S. Wang, S. Yeh, C. R. Tzeng, C. Chang // *Endocr Rev.* – 2009. – Vol. 30. – P. 119–132.

76. Apoptosis and testicular alterations in albino rats treated with etoposide during the prepubertal phase / T. Stumpp, E. Sasso-Cerri, E. Freymuller, S. Miraglia // *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* – 2004. – Vol. 279. – P. 611–622.

77. Ascoli, M. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective / M. Ascoli, F. Fanelli, D. L. Segaloff // *Endocr Rev.* – 2002. – Vol. 23. – P. 141–174.

78. Assessment of the androgen environment within the human testis: Minimally invasive method to obtain intratesticular fluid / J. P. Jarow, H. Chen, W. Rosner [et al.] // *J Androl.* – 2001. – Vol. 22. – P. 640–645.

79. Baker, H. W. Seminal plasma as an indicator of age-related decline in ejaculatory function / H. W. Baker, D. Y. Liu // *Asian Journal of Andrology.* – 2019. – Vol. 21 (1). – P. 5–12.

80. Bardin, C. W. The cell biology of the Sertoli cell / C. W. Bardin, G. L. Gunsalus, C. Y. Cheng // *Cell and molecular biology of the testis* / ed. C. Desjardins, L. Ewing. – New York : Oxford University Press, 1993. – P. 189–219.

81. Barrett, P. H. Neuroendocrine control of luteinizing hormone secretion in men: implications for diagnosis and treatment of hypogonadotropic hypogonadism / P. H. Barrett, J. D. Veldhuis // *European Journal of Endocrinology.* – 2020. – Vol. 182. – P. 21–33.

82. Beaud, H. Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia / H. Beaud, A. van Pelt, G. Delbes, // *Reproduction.* – 2017. – Vol. 153. – P. 725–735.

83. Berndtson, W. E. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats / W. E. Berndtson, T. L. Thompson // *J Androl.* – 1990. – Vol. 11. – P. 429–435.
84. Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men / J. P. Jarow, W. W. Wright, T. R. Brown [et al.] // *J Androl.* – 2005. – Vol. 26 (3). – P. 343–348.
85. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells / H. H. Yan, D. D. Mruk, W. M. Lee, C. Y. Cheng. // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – P. 1945–1959.
86. Boussouar, F. Lactate and energy metabolism in male germ cells / F. Boussouar, M. Benahmed // *Trends Endocrinol Metab.* – 2004. – Vol. 15. – P. 345–350.
87. Cancer treatment in childhood and testicular function: The importance of the somatic environment / J.-B. Stukenborg, K. Jahnukainen, M. Hutka, R. T. Mitchell, // *Endocr. Connect.* – 2018. – Vol. 7. – P. 69–87.
88. Carlsson, A. H. Development of spermatocytes and spermatids in man: morphometric studies at various stages of maturation / A. H. Carlsson, H. B. Heidenberg, U. Westphal // *Archives of Anatomy and Embryology.* – 2004. – Vol. 109 (1). – P. 1–12.
89. Carreau, S. Oestrogens and spermatogenesis / S. Carreau, R. A. Hess // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2010. – Vol. 365. – P. 1517–1535.
90. Chemes, H. E. Infancy is not a quiescent period of testicular development / H. E. Chemes // *Int. J. Androl.* – 2001. – Vol. 24. – P. 2–7.
91. Cheng, C. Y. Biochemistry of Sertoli cell/germ cell junctions, germ cell transport, and spermiation in the seminiferous epithelium / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // *Sertoli Cell Biology*, 2nd edition / ed. M. D. Griswold. – Amsterdam, Elsevier, 2015. – P. 333–383.
92. Cheng, C. Y. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // *Physiol*

Rev. – 2002. – Vol. 82. – P. 825–874.

93. Cheng, C. Y. The blood-testis barrier and its implications for male contraception / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // *Pharmacol Rev.* – 2012. – Vol. 64. – P. 16–64.

94. Chromosome abnormalities in human sperm nuclei detected by fluorescence in situ hybridization using locus-specific probes for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y / Q. Li, W. Zhu, R. Huo [et al.] // *Am J Med Genet.* – 1997. – Vol. 70 (1). – P. 55–60.

95. Clermont, Y. Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat / Y. Clermont, C. P. Leblond, B. Messier // *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* – 1959. – Vol. 48 (Suppl). – P. 37–55.

96. Clermont, Y. Endocytic activities of Sertoli cells in the rat / Y. Clermont, C. Morales, L. Hermo // *Ann NY Acad Sci.* – 1987. – Vol. 513. – P. 1–15.

97. Clermont, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal / Y. Clermont // *Physiol. Rev.* – 1972. – Vol. 52. – P. 198–236.

98. Clermont, Y. Renewal of spermatogonia in man / Y. Clermont // *Am J Anat.* – 1966. – Vol. 118 (2). – P. 509–524.

99. Clermont, Y. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique / Y. Clermont, C. P. Leblond // *Am J Anat.* – 1955. – Vol. 96 (2). – P. 229–253.

100. Clermont, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man / Y. Clermont // *Am J Anat.* – 1963. – Vol. 112. – P. 35–51.

101. Clonal analysis of the progeny of germ line stem cells from neonatal and adult mouse testes / B. Y. Ryu, K. E. Orwig, H. Kubota [et al.] // *Dev Biol.* – 2005. – Vol. 288 (2). – P. 329–340.

102. Comhaire, F. H. Low sperm counts and reduced motility in male smokers / F. H. Comhaire, L. Vermeulen // *International Journal of Fertility.* – 1985. – Vol. 30 (1). – P. 23–27.

103. Correlation between serum FSH concentration and sperm characteristics in infertile men / C. L. Cho, P. T. Chan, S. Y. Mak [et al.] // *Human Reproduction.* –

2000. – Vol. 15 (10). – P. 2185–2189.

104. Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: A report from the St Jude Lifetime Cohort Study / D. M. Green, W. Liu, W. H. Kutteh [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 1215–1223.

105. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: An emerging concept of regulation / M. W. Li, D. D. Mruk, W. M. Lee, C. Y. Cheng // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol. 20. – P. 329–338.

106. Cytokines, polarity proteins and endosomal protein trafficking and signaling – the Sertoli cell blood-testis barrier in vitro as a study model / X. Xiao, E. W. P. Wong, P. P. Y. Lie [et al.] // *Methods Enzymol.* – 2014. – Vol. 534. – P. 181–194.

107. De Kretser, D. M. The cytology of the testis / D. M. de Kretser, J. B. Kerr // *The Physiology of Reproduction.* – vol. 1 // ed. E. Knobil [et al.]. – New York : Raven Press; 1988. – P. 837–932.

108. De Kretser, D. M. Ultrastructural features of human spermiogenesis / D. M. de Kretser // *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* – 1969. – Vol. 98 (4). – P. 477–505.

109. Diagnosis and management of male infertility: summary of NICE guideline / J. M. Buchanan, D. J. Macey, L. Burch, N. H. Hart // *BMJ.* – 2001. – Vol. 343. – P. 6434.

110. Dominguez, F. Impact of adjuvant chemotherapy on ovarian reserve and pituitary-gonadal axis in breast cancer survivors / F. Dominguez, M. Pérez-Cervera, C. Simón // *Fertility and Sterility.* – 2016. – Vol. 106 (6). – P. 1394–1401.

111. Dose-dependent increase in intratesticular testosterone by very low-dose human chorionic gonadotropin in normal men with experimental gonadotropin deficiency / M. Y. Roth, S. T. Page, K. Lin [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 95. – P. 3806–3813.

112. Dym, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells / M. Dym // *Endocr Rev.* – 1994. – Vol. 15. – P. 102–115.

113. Effect of childhood cancer treatment on fertility markers in adult male long-term survivors / N. J. van Casteren, G. H. M. van der Linden, F. G. A. Hakvoort-

Cammel [et al.] // J. Pediatr. Blood Cancer. – 2009. – Vol. 52. – P. 108–112.

114. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells / L. Marcon, X. Zhang, B. F. Hales [et al.] // J. Androl. – 2011. – Vol. 32. – P. 432–443.

115. Effects of chemotherapy-induced testicular damage on inhibin, gonadotropin, and testosterone secretion: a prospective longitudinal study / E. M. Wallace, N. P. Groome, S. C. Riley, [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1997. – Vol. 82. – P. 3111–3115.

116. Ehmcke, J. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates // J. Ehmcke, S. Schlatt // Reproduction. – 2006. – Vol. 132. – P. 673–680.

117. Ehmcke, J. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives / J. Ehmcke, J. Wistuba, S. Schlatt // Human Reprod Update. – 2006. – Vol. 12. – P. 275–282.

118. Endocrine regulation of spermatogenesis / L. O'Donnell, S. J. Meachem, P. G. Stanton, R. I. McLachlan // Physiology of Reproduction / ed. J. D. Neill. – Amsterdam : Elsevier, 2006. – p. 1017–1069.

119. Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins / X. Xiao, D. D. Mruk, E. I. Tang [et al.] // Hum Reprod. – 2014. – Vol. 29. – P. 1279–1291.

120. Estrogen and spermatogenesis / L. O'Donnell, K. M. Robertson, M. E. Jones, E. R. Simpson // Endocr Rev. – 2001. – Vol. 22. – P. 289–318.

121. Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice / P. J. O'Shaughnessy, H. Johnston, L. Willerton, P. J. Baker // J Cell Sci. – 2002. – Vol. 115. – P. 3491–3496.

122. Feng, C. W. Control of mammalian germ cell entry into meiosis / C. W. Feng, J. Bowles, P. Koopman // Mol Cell Endocrinol. – 2014. – Vol. 382 (1). – P. 488–497.

123. Ferlin, A. Aging of the male reproductive system / A. Ferlin, A. Moretti, C. Foresta // Journal of Endocrinological Investigation. – 2016. – Vol. 39 (2). –

P. 151–161.

124. Fluoxetine induces changes in the testicle and testosterone in adult male rats exposed via placenta and lactation / W. O. Monteiro, M. T. Sandra, J. A. Marleyne [et al.] // *Syst Biol Reprod Med.* – 2014. – Vol. 60 (5). – P. 274–281.

125. Functional in vitro model to examine cancer therapy cytotoxicity in maturing rat testis / M. Nurmio, J. Toppari, J. Kallio [et al.] // *Reprod. Toxicol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 28–34.

126. Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis / X. Xiao, D. D. Mruk, C. K. Wong, C. Y. Cheng // *Physiology (Bethesda)*. – 2014. – Vol. 29 (4). – P. 286–298.

127. GLUT-dependent glucose metabolism sustains energy homeostasis in neurons and astrocytes under metabolic challenge / F. S. Heldt, A. S. Wenning, V. Hernandez-Hernandez [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2014.

128. Griswold, M. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis / M. Griswold // *Biol Reprod.* – 1995. – Vol. 52. – P. 211–216.

129. Griswold, M. D. The molecular biology of the FSH receptor / M. D. Griswold, L. Heckert, C. Linder // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 1995. – Vol. 53. – P. 215–218.

130. Guidelines on male infertility / A. Jungwirth, T. Diemer, G. Dohle [et al.]. – Arnhem, Netherlands : EAU Guidelines Office, 2015.

131. Handa, R. K. Impact of gonadotropins on steroid hormone synthesis in adult males / R. K. Handa, M. E. Jones, E. R. Simpson // *Journal of Endocrinology*. – 2019. – Vol. 240 (1). – P. 1–10.

132. Handelsman, D. J. Hormonal regulation of spermatogenesis: insights from constructing genetic models / D. J. Handelsman // *Reprod Fertil Dev.* – 2011. – Vol. 23. – P. 507–519.

133. Hecht, N. B. Protein synthesis and processing during mammalian spermiogenesis / N. B. Hecht, D. H. Marconi, A. J. Becker // *Experimental Cell Research*. – 2001. – Vol. 268 (1). – P. 1–10.

134. Heinrich, A. Essential roles of interstitial cells in testicular development

and function / A. Heinrich, T. DeFalco // *Andrologia*. – 2019. Vol. 8 (4). – P. 903–914.

135. Heller, C. G. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration / C. G. Heller, Y. Clermont // *Science*. – 1963. – Vol. 140 (3563). – P. 184–186.

136. Hess, R. A. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. / R. A. Hess, L. R. De Franca // *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* / ed. Y. Cheng. – *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – Vol. 636. – P.1–15.

137. High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer / P. Romerius, O. Ståhl, C. Moëll [et al.] // *Int. J. Androl*. – 2011. – Vol. 34. – P. 69–76.

138. High risk of hypogonadism in young male cancer survivors / S. Isaksson, K. Bogefors, O. Ståhl [et al.] // *Clin. Endocrinol*. – 2018. – Vol. 88. – P. 432–441.

139. Histological and immunohistochemical study of cyclophosphamide effect on adult rat testis / H. H. Anan, N. S. Wahba, M. A. Abdallah, D. A. Mohamed // *Int. J. Sci. Rep*. – 2017. – Vol. 3 (2). – P. 39–48.

140. Histological evaluation of the human testis – Approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review / R. I. McLachlan, E. Rajpert-De Meyts, C. E. Hoei-Hansen [et al.] // *Hum Reprod*. – 2007. – Vol. 22. – P. 2–16.

141. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive / R. McLachlan, L. O'Donnell, S. Meachem [et al.] // *J Androl*. – 2002. – Vol. 23. – P. 149–162.

142. How does chemotherapy treatment damage the prepubertal testis? / M. Allen, F. Lopes, R. T. Mitchell, N. Spears // *Reproduction*. – 2018. – Vol. 156. – P. 209–233.

143. Howlader, N. United States Cancer Statistics: Data Visualizations Tool, National Program of Cancer Registries and Surveillance, Epidemiology, and End Results Program / N. Howlader, K. A. Cronin, A. B. Mariotto. – Atlanta (GA) : Department of Health and Human Services, 2018. – 30 p.

144. Huhtaniemi, I. A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis / I. Huhtaniemi // *Hormones (Athens)*. – 2015. – Vol. 14. – P. 468–78.

145. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis

in rats, monkeys, and man / R. McLachlan, L. O'Donnell, S. Meachem [et al.] // Recent Prog Horm Res. – 2002. – Vol. 57. – P. 149–179.

146. IICC-3 contributor's international incidence of childhood cancer, 2001–2010: A population-based registry study / E. Steliarova-Foucher, M. Colombet, L. A. G. Ries [et al.] // Lancet Oncol. – 2017. – Vol. 18. – P. 719–731.

147. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: A prospective study by the French CECOS network / G. Martinez, M. Walschaerts, M. Le Mitouard [et al.] // Fertil. Steril. – 2017. – Vol. 107. – P. 341–350.

148. Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism / B. F. Oliveira, M. G. Alves, L. Rato [et al.] // Int J Androl. – 2011. – Vol. 34. – P. 612–620.

149. Interactions between Leydig and Sertoli cells modulate insulin signaling and glucose metabolism in porcine Sertoli cells / T. S. Brandão, G. A. Maciel, J. B. Figueiredo [et al.] // Animal Reproduction Science. – 2014.

150. Intratubular testosterone concentration is lower than serum level in healthy males: Implications for understanding local regulation of spermatogenesis / A. J. van der Hoorn, P. J. van der Linden, J. C. Boon [et al.] // Human Reproduction. – 2019. – Vol. 34 (6). – P. 1083–1091.

151. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations / C. Wang, R. S. Swerdloff, A. Iranmanesh [et al.] // Journal of Andrology. – 2009. – Vol. 30 (1). – P. 1–9.

152. Irreversible gonadal damage in male survivors of pediatric Hodgkin's disease / J. Heikens, H. Behrendt, R. Adriaanse, A. Berghout // Cancer. – 1996. – Vol. 78. – P. 2020–2024.

153. Jegou, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals / B. Jegou // Int Rev Cytol. – 1993. – Vol. 147. – P. 25–96.

154. Johnson, L. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats / L. Johnson, C. S. Petty, W. B. Neaves // Biol Reprod. – 1980. – Vol. 22 (5). – P. 1233–1243.

155. Kawakami, S. Regulation of leutinizing hormone secretion and subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadal steroids in perifused pituitary cells from male monkeys and rats / S. Kawakami, S. J. Winters // *Endocrinology*. – 1999. – Vol. 140. – P. 3587–3593.

156. Kidd, S. A. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature / S. A. Kidd, B. Eskenazi, A. J. Wyrobek // *Fertility and Sterility*. – 2001. – Vol. 75 (2). – P. 237–248.

157. Kubota, H. Growth factors essential for self-renewal and pluripotency of mouse spermatogonial stem cells / H. Kubota, M. R. Avarbock, R. L. Brinster // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101 (47). – P. 16489–16494.

158. Kumar, T. R. FSH beta knockout mouse model: a decade ago and into the future / T. R. Kumar // *Endocrine*. – 2009. – Vol. 36 (1). – P. 1–5.

159. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats / O. Brilhante, F. K. Okada, E. Sasso-Cerri [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 79.

160. Latronico, A. C. Inactivating mutations of the human luteinizing hormone receptor in both sexes / A. C. Latronico, I. J. Arnhold // *Semin Reprod Med.* – 2012. – Vol. 30. – P. 382–386.

161. Latronico, A. C. Naturally occurring mutations of the luteinizing-hormone receptor: Lessons learned about reproductive physiology and G protein-coupled receptors / A. C. Latronico, D. L. Segaloff // *Am J Human Genet.* – 1999. – Vol. 65. – P. 949–958.

162. Leblond, C. P. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat / C. P. Leblond, Y. Clermont // *Ann N Y Acad Sci.* – 1952. – Vol. 55 (4). – P. 548–573.

163. Liu, M. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line / M. Liu, B. F. Hales, B. Robaire // *Biol. Reprod.* – 2014. – Vol. 90. – P. 72.

164. Lotti, F. Effects of aging on erectile dysfunction and hypogonadism /

F. Lotti, G. Corona, M. Maggi // *Nature Reviews Urology*. – 2014. – Vol. 11 (2). – P. 95–106.

165. Maselli, J. The Effects of chemotherapy with bleomycin, etoposide, and cis-platinum (bep) on rat sperm chromatin remodeling, fecundity and testicular gene expression in the progeny / J. Maselli, B. F. Hales, B. Robaire // *Biol. Reprod.* – 2013. – Vol. 89. – P. 1–9.

166. Matzuk, M. M. Genes regulating spermatogenesis and fertility / M. M. Matzuk, D. J. Lamb // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2002. – Vol. 18. – P. 473–505.

167. McLachlan, R. I. Pathways of germ cell differentiation and spermatogenic failure in humans / R. I. McLachlan, L. O'Donnell, S. J. Meachem // *International Journal of Andrology*. – 2010. – Vol. 33 (1). – P. 21–33.

168. Mechanisms of infertility in men with varicocele / D. Kumar, A. Agarwal, S. S. du Plessis [et al.] // *Fertil Steril.* – 2014. – Vol. 102 (3). – P. 626–632.

169. Mossadegh-Keller, N. Testicular macrophages: Guardians of fertility / N. Mossadegh-Keller, M. H. Sieweke // *Cell Immunol.* – 2018. – Vol. 330. – P. 120–125.

170. Mruk, D. D. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis / D. D. Mruk, C. Y. Cheng // *Endocr Rev.* – 2004. – Vol. 25. – P. 747–806.

171. Muller, J. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles of 50 boys who suffered from sudden death / J. Muller, N. E. Skakkebaek // *Int J Androl.* – 1983. – Vol. 6. – P. 143–56.

172. Nieschlag, E. Endocrine testicular function in vivo and in vitro in infertile men / E. Nieschlag, E. J. Wickings, J. Mauss // *Acta Endocrinol.* – 1979. – Vol. 90. – P. 544–551.

173. O'Shaughnessy, P. J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis / P. J. O'Shaughnessy // *Semin Cell Dev Biol.* – 2014. – Vol. 29. – P. 55–65.

174. Oakberg, E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium / E. F. Oakberg // *Am J Anat.* – 1956.

– Vol. 99 (3). – P. 507–516.

175. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa / T. T. Turner, C. C. Jones, S. S. Howards [et al.] // *Endocrinology*. – 1984. – Vol. 115. – P. 1925–1932.

176. Overlapping dose responses of spermatogenic and extragonadal testosterone actions jeopardize the principle of hormonal male contraception / O. O. Oduwole, N. Vydra, N. E. Wood [et al.] // *FASEB J.* – 2014. – Vol. 28. – P. 2566–2576.

177. Plant, T. M. The functional significance of SH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates / T. M. Plant, G. R. Marshall // *Endocr Rev.* – 2001. – Vol. 22. – P. 764–786.

178. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood / R. M. Sharpe, C. McKinnell, C. Kivlin, J. S. Fisher // *Reproduction*. – 2003. – Vol. 125. – P. 769–784.

179. Purification of gonadotropin surge inhibiting factor from Sertoli cell-enriched culture medium / S. Tio, D. Koppelaar, C. Bardin, C. Cheng // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1994. – Vol. 199. – P. 1229–1236.

180. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline / L. Johnson, R. S. Zane, C. S. Petty, W. B. Neaves // *Biol Reprod.* – 1984. – Vol. 31. – P. 785–795.

181. Recombinant human follicle-stimulating hormone as a pretreatment for idiopathic oligoasthenoteratozoospermic patients undergoing intracytoplasmic sperm injection / E. Caroppo, C. Niederberger, G. M. Vizziello, G. D'Amato // *Fertil Steril.* – 2003. – Vol. 80. – P. 1398–1403.

182. Recovery of ovarian function and fertility after adjuvant chemotherapy for breast cancer: A comprehensive review / J. Bellver, M. A. Melo, E. Bosch [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2015. – Vol. 21 (4). – P. 465–483.

183. Reddy, G. P. Oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin in male reproductive system / G. P. Reddy, N. Pandiyan, P. R. Subbarayan // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 96. – P. 125–136.

184. Regulation of spermiogenesis by histone deacetylation and testis-specific transcription factors / K. Nayernia, J. H. Lee, N. Drusenheimer [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102 (47). – P. 17011–17016.
185. Relationship between serum inhibin B, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and testosterone concentrations in men with normal and impaired spermatogenesis / M. Simoni, G. F. Weinbauer, J. Gromoll [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 1997. – Vol. 82 (11). – P. 3555–3561.
186. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes / Y. Zhang, J. Yu, X. D. Dong, H. Y. Ji // *Molecules.* – 2017. – Vol. 23 (1). – P. 20.
187. Resistance to apoptosis and autophagy leads to enhanced survival in Sertoli cells / F. Aslani, T. Sebastian, M. Keidel [et al.] // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* – 2017. – Vol. 23. – P. 370–380.
188. Roosen-Runge, E. C. Kinetics of spermatogenesis in mammals / E. C. Roosen-Runge // *Ann N Y Acad Sci.* – 1952. – Vol. 55 (4). – P. 574–584.
189. Rossi, E. A. Signaling cascades regulating etoposide-induced apoptosis in spermatogenic epithelial cells / E. A. Rossi, L. Larribere, A. J. Levine // *Journal of Biological Chemistry.* – 2015. – Vol. 290 (22). – P. 13851–13862.
190. Saez, J. M. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation / J. M. Saez // *Endocr Rev.* – 1994. – Vol. 15. – P. 574–626.
191. Saleh, R. A. Effects of chemotherapeutic drugs on male fertility / R. A. Saleh, A. Agarwal, D. R. Nelson // *Systematic Reviews in Urology.* – 2013. – Vol. 1 (1). – P. 1–13.
192. Santi, D. Folliclestimulating hormone treatment of male idiopathic infertility improves pregnancy rate: a meta-analysis / D. Santi, A. R. Granata, M. Simoni // *Endocr Connect.* – 2015. – Vol. 4. – P. 46–58.
193. Saxena, A. K. Idiopathic unobstructive azoospermia: etiology, diagnosis and management / A. K. Saxena, P. B. Singh, M. K. Pal // *Indian Journal of Urology.* – 2005.
194. Schlatt, S. Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective / S. Schlatt, J. Ehmcke // *Semin Cell Dev Biol.* – 2014. – Vol. 29. – P. 2–16.

195. Schulze, C. Morphological characteristics of the spermatogonial stem cells in man / C. Schulze // *Cell Tissue Res.* – 1979. – Vol. 198 (2). – P. 191–199.
196. Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy / B. B.-S. Maymon, L. Yogev, A. Marks [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 81. – P. 1391–1394.
197. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis / D. Rebourcet, P. J. O'Shaughnessy, J. L. Pitetti [et al.] // *Development.* – 2014. – Vol. 141 (10). – P. 2139–2149.
198. Sertoli-Leydig cell communications / J. M. Saez, O. Avallet, D. Naville [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 1989. – Vol. 564. – P. 210–31.
199. Serum LH correlates highly with intratesticular steroid levels in normalmen / M. Y. Roth, K. Lin, J. K. Amory [et al.] // *J Androl.* – 2009. – Vol. 31. – P. 138–145.
200. Setchell, B. Limitations imposed by testicular blood flow on the function of Leydig cells in rats in vivo / B. Setchell, K. Galil // *Aust. J. Biol. Sci.* – 1983. – Vol. 36. – P. 285–293.
201. Sharpe, R. M. Regulation of spermatogenesis / Sharpe R.M. // *The Physiology of Reproduction* / eds. E. Knobil, J. D. Neill. – New York : Raven Press, 1994. – P. 1363–1434.
202. Shinjo, E. The effect of human chorionic gonadotropin-based hormonal therapy on intratesticular testosterone levels and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia / E. Shinjo, K. Shiraishi, H. Matsuyama // *Andrology.* – 2013. – Vol. 1 (6). – P. 929–935.
203. Siegel, R. L. Cancer statistics / R. L. Siegel, A. N. Giaquinto, A. Jemal // *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* – 2024. – Vol. 74 (1). – P. 12–49.
204. Singh, R. K. Involvement of MAPKs and caspases in etoposide-induced apoptotic death of spermatogenic epithelial cells / R. K. Singh, A. Tripathi, Y. C. Awasthi // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* – 2017. – Vol. 1864 (11). – P. 2055–2064.
205. Siu, M. K. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix

in the testis / M. K. Siu, C. Y. Cheng // *BioEssays*. – 2004. – Vol. 26. – P. 978–992.

206. Skinner, M. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components / M. Skinner, P. Tung, I. Fritz // *J Cell Biol.* – 1985. – Vol. 100. – P. 1941–1947.

207. Skinner, M. K. Purification of a paracrine factor, P-Mod-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function / M. K. Skinner, P. M. Fetterolf, C. T. Anthony // *J Biol Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 2884–2890.

208. Sperm abnormalities induced by pre-pubertal exposure to cyclophosphamide are effectively mitigated by *Moringa oleifera* leaf extract / G. Nayak, A. Vadinkar, S. Nair [et al.] // *Andrologia*. – 2016. – Vol. 48. – P. 125–136.

209. Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors / C. M. O’Flaherty, P. T. Chan, B. F. Hales, B. Robaire // *J. Androl.* – 2012. – Vol. 33. – P. 629–636.

210. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals / T. R. Dias, M. G. Alves, B. M. Silva, B. F. Oliveiram // *Mol Cell Endocrinol.* – 2014. – Vol. 396. – P. 37–45.

211. Spermatogenesis in humans and its affecting factors / F. T. Neto, P. V. Bach, B. B. Najari [et al.] // *Semin Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol. 59. – P. 10–26.

212. Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison / C. Boitani, S. Di Persio, V. Esposito, E. Vicini // *Semin Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol. 59. – P. 79–88.

213. Spermiation: the process of sperm release / L. O’Donnell, P. K. Nicholls, M. K. O’Bryan [et al.] // *Spermatogenesis*. – 2011. – Vol. 1. – P. 14–35.

214. Stanton, P. G. Regulation of the blood-testis barrier / P. G. Stanton // *Semin Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol. 59. – P. 166–173.

215. Stewart, B. W. World Cancer Report 2014 / B. W. Stewart, C. P. Wild. – Lyon, France : International Agency for Research on Cancer, 2014.

216. Studies of the human testis. XVII. Gonadotropin regulation of intratesticular testosterone and estradiol in infertile men / J. Takahashi, Y. Higashi, J. A. Lanasa [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1982. – Vol. 55. – P. 1073–1080.

217. Stumpp, T. Sertoli cell function in albino rats treated with etoposide

during prepubertal phase / T. Stumpp, E. Freymüller, S. M. Miraglia // *Histochem. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 126. – P. 353–361.

218. Testosterone production and transport dynamics in interstitial fluid surrounding Leydig cells / H. G. Lee, S. H. Kim, B. C. Chung [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 2020. – Vol. 102 (3). – P. 643–652.

219. The effects of etoposide on testicular function in boys treated for Hodgkin's disease / L. Gerres, J. H. Brämswig, W. Schlegel [et al.] // *Cancer.* – 1998. – Vol. 83. – P. 2217–2222.

220. The Effects of l-carnitine against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis / Y. Cao, X. Wang, S. Li [et al.] // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2017. – Vol. 120. – P. 152–158.

221. The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence / J. H. Brämswig, U. Heimes, E. Heiermann [et al.] // *Cancer.* – 1990. – Vol. 65. – P. 1298–1302.

222. The heterogeneity of rat androgen binding protein (rABP) in the vascular compartment differs from that in the testicular tubular lumen: further evidence for bidirectional secretion of rABP / C. Y. Cheng, G. L. Gunsalus, I. D. Morris [et al.] // *J Androl.* – 1986. – Vol. 7. – P. 175–179.

223. The impact of chemotherapy on Leydig cell function in long-term survivors of germ cell tumors / A. Gerl, D. Mühlbayer, G. Hansmann [et al.] // *Cancer.* – 2001. – Vol. 91. – P. 1297–1303.

224. The impact of vincristine on testicular development and function in childhood cancer / I. Clark, M. F. H. Brougham, N. Spears, R. T. Mitchell // *Hum. Reprod. Update.* – 2023. – Vol. 29 (2). – P. 233–245.

225. The incidence and severity of oral mucositis among allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients: a systematic review / H. M. Chaudhry, A. J. Bruce, R. C. Wolf [et al.] // *Biol Blood Marrow Transplant.* – 2016. – Vol. 22 (4). – P. 605–616.

226. Themmen, A. P. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors:

Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function / A. P. Themmen, I. T. Huhtaniemi // *Endocr Rev.* – 2000. – Vol. 21. – P. 551–583.

227. Three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma / R. I. Fisher, R. E. Gaynor, S. Dahlberg [et al.] // *N Engl J Med.* – 1993. – Vol. 328 (14). – P. 1002–1006.

228. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships / J. E. Weber, L. D. Russell, V. Wong, R. N. Peterson // *Am J Anat.* – 1983. – Vol. 167. – P. 163–179.

229. Toxicological and genotoxicity assessment of a dihydroquercetin-rich dahurian larch tree (*Larix gmelinii* Rupr) extract (Lavitol) / A. G. Schauss, S. S. Tselyico, V. A. Kuznetsova, I. Yegorova // *Int J Toxicol.* – 2015. – Vol. 34 (2). – P. 162–181.

230. Tremblay, A. R. In vitro study of doxorubicin-induced oxidative stress in spermatogonia and immature sertoli cells / A. R. Tremblay, G. Delbes // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 348. – P. 32–42.

231. Vendramini, V. Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest / V. Vendramini, B. Robaire, S. M. Miraglia // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 27. – P. 2457–2466.

232. Walker, W. H. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells / W. H. Walker, J. Cheng // *Reproduction.* – 2005. – Vol. 130. – P. 15–28.

233. Wang, Z. X. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by sterological methods / Z. X. Wang, N. G. Wreford, D. M. de Kretser // *Int J Androl.* – 1989. – Vol. 12. – P. 58–64.

234. Warburg effect revisited – lesion from the Sertoli cell / P. F. Oliveira, A. D. Martins, A. C. Moreira [et al.] // *The Med Res Rev.* – 2015. – Vol. 35. – P. 126–51.

235. Wing, T. Y. Morphometric studies on rat seminiferous tubules / T. Y. Wing, A. K. Christensen // *Am J Anat.* – 1982. – Vol. 165. – P. 13–25.

236. Wt1 dictates the fate of fetal and adult Leydig cells during development in the mouse testis / Q. Wen, Q. S. Zheng, X. X. Li [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol*

Metab. – 2014. – Vol. 307 (12). – P. 1131–1143.

237. Zitzmann, M. Effects of age on male fertility / M. Zitzmann // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2013. – Vol. 27. – P. 617–628.

238. Zwain, I. Identification of an inhibitory factor from a Sertoli clonal cell line (TM4) that modulates adult rat Leydig cell steroidogenesis / I. Zwain, P. L. Morris, C. Y. Cheng // Mol Cell Endocrinol. – 1991. – Vol. 80. – P. 115–126.

239. Zwain, I. H. Rat seminiferous tubular culture medium contains a biological factor that inhibits Leydig cell steroidogenesis: its purification and mechanism of action / I. H. Zwain, C. Y. Cheng // Mol Cell Endocrinol. – 1994. – Vol. 104. – P. 213–227.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Характеристика белочной оболочки животных экспериментальных групп: А – семенник крысы первой экспериментальной группы на 7-е сутки после первого курса ПХТ: утолщение белочной оболочки, отёк стромы, отслоение сперматогенного эпителия от оболочки канальцев; Б – семенник крысы второй экспериментальной группы на 14-е сутки после первого курса ПХТ: утолщение белочной оболочки, разволокнение базальной мембраны, отслоение сперматогенного эпителия, единичные сперматозоиды в просвете семенного извитого канальца, очаговый синдром клеток Сертоли. Гем и эозин, ув. $\times 40$ С. 50
2. Рисунок 2 – Семенник крысы 2-й экспериментальной группы, 7-е сутки. Отслоение сперматогенного эпителия от оболочки канальцев, разрыхление и истончение сперматогенного эпителия, утолщение и разволокнение базальной мембраны, синдром клеток Сертоли, выраженный отек стромы, уменьшение количества клеток Лейдига, сопровождающееся кариопикнозом. Гем и эозин. Ув. $\times 40$. . С. 52
3. Рисунок 3 – Толщина соединительнотканной капсулы яичек экспериментальных животных. С. 53
4. Рисунок 4 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы, 7-е сутки. Уменьшение толщины сперматогенного эпителия, в просвете семенного извитого канальца единичные поврежденные сперматозоиды; гем и эозин; ув. $\times 40$; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы, 7-е сутки. Формирование четких контуров клеток сперматогенного эпителия; гем и эозин; ув. $\times 25$ С. 54
5. Рисунок 5 – Семенник крысы первой экспериментальной группы 14-е сутки. Десквамация сперматогенного эпителия, сидром клеток

- Сертоли, выраженный отек стромы. Гем и эозин. Ув. $\times 40$ С. 56
6. Рисунок 6 – Динамические изменения толщины сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп (мкм) . С. 56
7. Рисунок 7 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп после повторного курса химиотерапии: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы на 14-е сутки, после повторного курса ПХТ; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы на 14-е сутки, после повторного курса ПХТ с ежедневным приемом антиоксиданта. Ядра клеток сперматогенного эпителия представлены гиперхромными глыбками, в просвете единичные поврежденные сперматозоиды. Гем и эозин. Ув. $\times 40$ С. 57
8. Рисунок 8 – Динамические изменения стромально-паренхиматозного соотношение семенников крыс экспериментальных групп (7–14-е сутки) С. 59
9. Рисунок 9 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп после повторного курса химиотерапии: А – семенник крысы первой экспериментальной группы после повторного введения комплекса противоопухолевых препаратов на 14-е сутки. Отмечаются единичные клетки сперматогенного эпителия. Гем и эозин. Ув. $\times 25$; Б – семенник крысы второй экспериментальной группы на 14-е сутки после повторного введения комплекса противоопухолевых препаратов. Формирование промежутков в виде пустот, с образованием четких межклеточных границ. Гем и эозин. Ув. $\times 40$ С. 60
10. Рисунок 10 – Динамические изменения среднего количества сперматогенных клеток в канальце исследуемых животных (7–14-е сутки) С. 61
11. Рисунок 11 – Динамические изменения среднего количества сперматогоний на поперечном срезе канальце после проведения

- химиопрепаратов (7–14-е сутки) С. 62
12. Рисунок 12 – Динамические изменения среднего количества сперматоцитов, сперматид, сперматозоидов после проведения химиопрепаратов (7–14-е сутки) С. 62
13. Рисунок 13 – Семенник крысы первой экспериментальной группы 14-е сутки. Интрануклеарная реакция с p53 средней интенсивности в отдельных клетках сперматогенного эпителия (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 40$) С. 64
14. Рисунок 14 – Семенник крысы первой экспериментальной группы 14-е сутки. Положительная реакция с caspasa-9 (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 100$) С. 65
15. Рисунок 15 – Динамические изменения количества морфофункциональных форм клеток Лейдига СНОР (7–14-е сутки) (%). С. 70
16. Рисунок 16 – Характеристика стромального компонента животных экспериментальных групп после повторного курса химиотерапии: А – семенники крыс первой экспериментальной группы после повторного курса противоопухолевой терапии на 14-е сутки. Выраженный отек стромы, отслоение сперматогенного эпителия, разрыхления и истончение сперматогенного эпителия. Уменьшение количества клеток Лейдига, сопровождающееся кариопикнозом. Гем и эозин. Ув. $\times 25$; Б – семенник крысы 1-й экспериментальной группы на 14-е сутки. Отек стромы, кариопикноз в клетках Лейдига, десквамация сперматогенного эпителия. Гем и эозин. Ув. $\times 40$ С. 71
17. Рисунок 17 – Патологические формы сперматозоидов: А – эпидидимальные сперматозоиды крыс 1-ой экспериментальной группы 14-е сутки: красным цветом выделен дефект хвостового отдела (укороченный хвост), желтым – цитоплазматическая капля в хвостовом отделе, синим – удвоение хвоста, дефект тела; Б – эпидидимальные сперматозоиды крыс 1-ой экспериментальной

- группы 14-е сутки: зеленым цветом выделено удвоение головки, черным – дефект головки (отсутствие головки) С. 78
18. Рисунок 18 – Динамика содержания прогрессивно-подвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 7-е сутки С. 82
19. Рисунок 19 – Динамика содержания неподвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 7-е сутки С. 82
20. Рисунок 20 – Динамика изменения индекса фертильности животных контрольной и экспериментальных групп на 7-е сутки С. 83
21. Рисунок 21 – Динамика содержания прогрессивно подвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 14-е сутки С. 83
22. Рисунок 22 – Динамика содержания неподвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 14-е сутки С. 84
23. Рисунок 23 – Динамика изменения индекса фертильности животных контрольной и экспериментальных групп на 14-е сутки . С. 84
24. Рисунок 24 – Динамические изменения среднего количества сперматогенных клеток в канальце исследуемых животных (21–35-е сутки) С. 94
25. Рисунок 25 – Динамические изменения среднего количества сперматогенных клеток в канальце исследуемых животных (21–35-е сутки) С. 95
26. Рисунок 26 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп на 21-е сутки исследования:
 А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы 21-е сутки: десквамация клеток сперматогенного эпителия. Гем. Эозин. Ув. × 40; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы: восстановление сперматогенного эпителия, вакуоль в толще

- сперматогенного эпителия, склероз стенок артериол, отек стромы.
Гем. Эозин. Ув. $\times 25$ С. 95
27. Рисунок 27 – Характеристика сперматогенного эпителия животных экспериментальных групп на 35-е сутки исследования: А – семенник крысы 1-й экспериментальной группы 35-е сутки: восстановление сперматогенного эпителия, утолщение стенки артериолы, массивный отек стромы; Б – семенник крысы 2-й экспериментальной группы 35-е сутки: восстановление сперматогенного эпителия, вакуоль в толще сперматогенного эпителия, сохранение пространств между клетками сперматогенного эпителия. Гем. Эозин. Ув. $\times 40$ С. 96
28. Рисунок 28 – Динамические изменения среднего количества сперматоцитов, сперматид, сперматозоидов в канальце исследуемых животных (21–35-е сутки) С. 97
29. Рисунок 29 – Семенник крысы 1-й экспериментальной группы, 35-е сутки. Восстановление клеток сперматогенного эпителия, сохраняются промежутки между сперматогенными клетками, отек стромы, клетки Лейдига с проявлениями зернистой дистрофии. Гем. Эозин. $\times 40$ С. 98
30. Рисунок 30 – Семенник крысы второй экспериментальной группы на 35-е сутки, интрануклеарная реакция с Ki-67 высокой интенсивности в отдельных клетках сперматогенного эпителия (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм) С. 99
31. Рисунок 31 – Динамика изменений количества морфофункциональных форм клеток Лейдига у животных экспериментальных групп (21–35-е сутки) С. 105
32. Рисунок 32 – Динамические изменения объема клеток Лейдига в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки) С. 106
33. Рисунок 33 – Динамические изменения диаметра ядер клеток Лейдига в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки) С. 107

34.	Рисунок 34 – Динамические изменения уровня тестостерона в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки)	С. 108
35.	Рисунок 35 – Динамические изменения количества патологических форм сперматозоидов в зависимости от сроков исследования (7–35-е сутки)	С. 113
36.	Рисунок 36 – Патологические формы сперматозоидов крысы 1-ой экспериментальной группы 35-е сутки	С. 114
37.	Рисунок 37 – Динамические изменения фракции прогрессивно подвижных сперматозоидов в эпидидимальной суспензии животных контрольной и экспериментальных групп на 35-е сутки	С. 117
38.	Рисунок 38 – Динамические изменения индекса фертильности животных контрольной и экспериментальных групп на 35-е сутки .	С. 118
39.	Таблица 1 – Этапы проведения исследования	С. 39
40.	Таблица 2 – Динамические изменения объемно-весовых параметров семенников крыс контрольной и экспериментальных групп (7–14-е сутки) (Me)	С. 49
41.	Таблица 3 – Динамические изменения стромально-паренхиматозного соотношения у животных контрольной и экспериментальных групп (7–14-е сутки)	С. 51
42.	Таблица 4 – Динамические изменение толщины сперматогенного эпителия (7–14-е сутки)	С. 57
43.	Таблица 5 – Динамические изменения сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп из расчета на один семенной каналец (7–14-е сутки) (Me)	С. 67
44.	Таблица 6 – Результаты морфометрического исследования клеток Лейдига при применении противоопухолевой химиотерапии (7–14-е сутки) (Me)	С. 72
45.	Таблица 7 – Динамические изменения уровня половых гормонов животных контрольной и экспериментальных групп (7–14-е сутки) (Me)	С. 76

46. Таблица 8 – Динамические изменение сперматозоидов животных контрольной и экспериментальных групп в зависимости от сроков проведения исследования (7–14-е сутки) С. 86
47. Таблица 9 – Динамические изменения макроскопических параметров семенников животных контрольной и экспериментальных групп, после перенесенной химиотерапии (21–35-е сутки) (Ме) С. 89
48. Таблица 10 – Динамические изменения стромально-паренхиматозного соотношения животных контрольной и экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме) С. 90
49. Таблица 11 – Динамические изменения толщины сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме) С. 92
50. Таблица 12 – Динамические изменения клеток сперматогенного эпителия животных контрольной и экспериментальных групп из расчета на один семенной каналец (21–35-е сутки) (Ме) С. 102
51. Таблица 13 – Результаты морфометрического исследования клеток Лейдига семенников крыс экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме) С. 108
52. Таблица 14 – Динамические изменения уровня половых гормонов животных контрольной и экспериментальных групп (21–35-е сутки) (Ме) С. 110
53. Таблица 15 – Динамические изменения сперматозоидов в зависимости от сроков проведения исследования (21–35-е сутки) . . С. 119
54. Таблица 16 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 7-е сутки после 1-го курса ПХТ С. 124
55. Таблица 17 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 7-е сутки после 1-го курса ПХТ + ДГК . С. 125
56. Таблица 18 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 14-е сутки после 2-го курса ПХТ С. 126

57. Таблица 19 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 14-е сутки после 2-го курса ПХТ + ДГК С. 126
58. Таблица 20 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 21-е сутки после 2-го курса ПХТ С. 127
59. Таблица 21 – Корреляционные связи между показателями семенника на 21-е сутки после 2-го курса ПХТ + ДГК С. 128
60. Таблица 22 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 35-е сутки после 2-го курса ПХТ С. 128
61. Таблица 23 – Корреляционные связи между морфологическими показателями семенников: 35-е сутки после 2-го курса ПХТ + ДГК С. 129