

Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет  
Караганды»

УДК 618.111-615.009-06

На правах рукописи

**ТУРДЫБЕКОВА ЯСМИНУР ГАБДУЛХАКОВНА**

**Оценка фолликулогенеза и геномной нестабильности у самок белых крыс  
и их потомства при ингаляционном воздействии химическими  
загрязнителями (экспериментальное исследование)**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научный консультант:  
д.б.н. профессор Култанов Б.Ж.  
к.м.н. Есимова Р.Ж.  
Зарубежный консультант:  
д.м.н., профессор Маринкин И.О.

Республика Казахстан  
Караганда, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b>	4
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b>	5
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b>	6
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>1 ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ И ГЕНОМНУЮ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>	12
1.1 Экологическая проблема Аральского региона	12
1.2 Фолликулогенез и фолликулярный запас яичника в норме и патологии	19
1.3 Влияние химических факторов на наследственный материал	26
1.4 Биохимические изменения в органах репродуктивной системы и организма в целом при воздействии химических загрязнителей	28
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	34
2.1 Общая характеристика экспериментального материала	34
2.2 Накопление химических веществ в тканях яичников крыс	37
2.3 Морфологическая оценка состояния яичников белых крыс	39
2.4 Влияние химических загрязнителей, входящих в пыле-солевые аэрозоли Аральского моря, на наследственный материал самок крыс и их потомства	41
2.5 Оценка окислительного стресса у самок крыс и их потомства в крови и гомогенате яичников	43
2.6 Статистическая обработка	44
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	45
3.1 Накопление тяжелых металлов в ткани яичника	45
3.2 Морфологическая характеристика ткани яичников самок белых крыс и их потомства под воздействием пыле – солевых аэрозолей Аральского моря	49
3.3 Цитогенетическая характеристика наследственного материала самок белых крыс и их потомства под воздействием пыле – солевых аэрозолей Аральского моря	90
3.4 Характеристика состояния продуктов окислительного стресса в крови и гомогенате яичников у самок крыс и их потомства при воздействии пыле-солевых аэрозолей Аральского моря	94
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	100
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	109
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А – Свидетельство о регистрации авторского права</b>	124
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Акт исследования дисперсии пыли</b>	125
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В – Акт исследования химического состава пыли</b>	127
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Акт атомно-абсорбционного исследования ткани яичников</b>	128

<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д</b> – Акт внедрения в учебный процесс	129
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Е</b> – Акт внедрения в учебный процесс	130
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Ж</b> – Акт внедрения	131

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативно-правовые акты и стандарты:

Закон Республики Казахстан от 30 июня 1992 года № 1468-ХІІ «О социальной защите граждан, пострадавших вследствие экологического бедствия в Приаралье».

Кодекс Республики Казахстан «О здоровье народа и системе здравоохранения» от 18 сентября 2009 года № 193-ІV.

Кодекс Республики Казахстан от 9 января 2007 года № 212 «Экологический кодекс Республики Казахстан».

Санитарно-гигиенические нормативы к атмосферному воздуху в городских и сельских населенных пунктах в Республике Казахстан, утвержденные приказом Министра национальной экономики РК №168 от 28.02.2015.

Программа по охране репродуктивного здоровья является одной из приоритетных направлений Программы «Здоровый образ жизни», утвержденной постановлением Правительства № 1260 от 21 декабря 2007 года.

Клинический протокол диагностики и лечения «невынашивание беременности», Одобрено Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от «2» сентября 2016 года Протокол №15

Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Приказ Министра Здравоохранения от 25.07.2007 № 442 «Об утверждении правил доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан».

ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

**Прогениторные клетки** – стволовые клетки, детерминированные на дифференцировку в определённый тип клеток. Прогениторные клетки выполняют роль стволовых клеток взрослого организма занятых пополнением пула специализированных клеток организма.

**Фолликулогенез** – это непрерывный процесс созревания фолликулов который, начавшись в антенатальном периоде, заканчивается лишь после наступления менопаузы.

**Фолликулярный резерв (овариальный)** – это количество фолликулов с яйцеклетками, которые в процессе развития могут овулировать зрелой яйцеклеткой.

**Менархе** – с древнегреческого «начало месяца» – первое менструальное кровотечение в жизни девочки. Наступает менархе у большинства девочек в 11-13 лет.

**Менопауза** – это последняя самостоятельная менструация, обусловленная функцией яичников: дату, устанавливают ретроспективно, а именно после 12 месяцев отсутствия менструации. Естественная менопауза связана с возрастным истощением запаса фолликулов в яичниках. Она обычно наступает в возрасте от 45 до 55 лет.

**Привычное невынашивание** – по определению ВОЗ – это наличие в анамнезе женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроке до 22 недель.

**Геномная нестабильность** – определяется частотой мутации и проявляется на клеточном, хромосомном и геномном уровнях. Причиной геномной нестабильности могут быть эндогенные и экзогенные.

**Окислительный стресс** – процесс повреждения клетки в результате его окисления за счет образование большого количества активных форм кислорода, и/или снижения антиоксидантной защиты.

**Овариальный резерв (или фолликулярный запас)** – это количество женских половых клеток (яйцеклеток), которые могут участвовать в оплодотворении.

**Циануровая кислота** – гетероциклическая кислота, которая получается путем пиролиза мочевины и используется для производства эффективных отбеливающих и дезинфицирующих средств, полимеров.

**Меламин** – бесцветные кристаллы, широко применяемые в промышленном органическом синтезе, в том числе ионообменных смол, дубителей, гексахлормеламина, используемого в производстве красителей и гербицидов.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

МДА – Малоновый диальдегид  
КАТ – Кatalаза  
ГПО – Глутатионпероксидаза  
ПОЛ – Перекисное окисление липидов  
АОЗ – Антиоксидантная защита  
Р – уровень статистической значимости  
РК – Республика Казахстан  
МЗ – Министерство Здравоохранения  
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения  
МЯ – микроядро  
ХА – хромосомные aberrации  
Мкм – микрометр  
КГ – комплекс Гольджи  
Я – ядро  
М – митохондрии  
ZP – zona pellucida  
ПДК – предельно допустимая концентрация  
S – площадь  
R – радиус  
ДИ – доверительный интервал  
ЦНС – центральная нервная система

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Было показано, что загрязнение воздуха связано с многочисленными патологиями, обычно сердечно-сосудистыми и респираторными. Атмосфера является общим ресурсом, поэтому масштаб воздействия загрязнения воздуха может варьироваться от местного до трансграничного [1].

Известно, что многие загрязнители воздуха оказывают вредное воздействие при следовых концентрациях, в то время как потенциальные последствия хронического воздействия низких концентраций некоторых видов в атмосфере еще не определены. Это требует постоянной разработки чувствительных методов исследования для регистрации возможных нарушений по всем органам и системам, чтобы развивать научное понимание и систему профилактики в здравоохранении [2].

Репродуктивный потенциал страны включает в себя способность популяции к росту при оптимальных условиях в стабильном возрастном составе [3, 4]. Следовательно, на репродуктивный потенциал напрямую оказывает влияние состояние фолликулярного запаса и процесса фолликулогенеза в целом. По данным некоторых авторов установлено, что загрязнители окружающей среды являются одним из этиологических факторов преждевременного истощения яичников основным механизмом этого, является увеличение количества атрезированных фолликулов [5-7].

Основными показателями репродуктивного здоровья являются способность к зачатию, рождаемость, репродуктивные потери. Так же показателем репродуктивного здоровья можно считать временные показатели наступления менархе, раннюю или преждевременную менопаузу.

Возможно негативное влияние на репродуктивную систему опосредуется через нарушение равновесия в системе ПОЛ-АОЗ.

Перекисное окисление липидов модифицирует липиды и жирные кислоты в мембранах сперматозоидов и ооцитов. Эти модифицированные побочные продукты в значительной степени влияют на жизнеспособность и общее качество репродуктивных клеток, увеличивая вероятность бесплодия. Ооциты содержат большое количество липидов, которые могут быть затронутым перекисным окислением липидов.

В мировой литературе имеются данные, что более 30 % эмбрионов погибает до рождения из-за наличия генетических дефектов несовместимых с жизнью [8]. К этой же группе относятся пациентки с повторяющимися выкидышами в анамнезе, неразвивающимися беременностями и рождением детей с множественными пороками развития. Возможно повреждения материнского генома происходит в период длительного покоя до повторной активации мейоза в процессе фолликулогенеза на стадии примордиальных фолликулов, или повреждение ооцита происходит под действием окислительного стресса на последних стадиях роста.

Считается, что одни и те же антропогенные факторы могут влиять по-разному в разных климатических условиях.

Пыле - солевые аэрозоли Аральского моря по своему составу представляют сложную многокомпонентную смесь химических веществ, которая распространяется на тысячи километров, и десятилетиями вдыхается населением, проживающим в регионе Аральского моря и не только. Частицы пыли оседают на растениях, попадают в почву и путем использования растительной пищи и воды, так же попадают в организм человека. Накапливающиеся в организме чужеродные вещества, оказывают повреждающее влияние на формирование репродуктивной функции, созревание яйцеклетки [9-11].

Отдельные компоненты этих аэрозолей были изучены в разрезе изучения эффектов горнодобывающей и других промышленности [12]. Есть работы по изучению накопления вредных веществ в волосах, грудном молоке у населения, проживающего в Аральском регионе [13]. Также имеются ряд экспериментальных работ, посвященных изучению влияния экологических факторов на мужскую репродуктивную систему [14, 15].

С целью оценки здоровья населения, проживающего в экологически неблагоприятном регионе, было проведено масштабное клиническо-лабораторное исследование в рамках НТП «Комплексные подходы в управлении состоянием здоровья населения Приаралья» 2014-2016 гг. По данным этого исследования: мы выявили, что у женщин, проживающих в районе Аральского кризиса и катастрофы, отмечается тенденция к ранней или преждевременной менопаузе, позднее наступление менархе. Средний возраст наступления менопаузы у жительниц Актюбинской области составил по данным наших исследований 41,5 лет [16, 17].

Несмотря на многочисленные клинико-экспериментальные исследования из данных анализа литературных источников, мы сделали вывод, что нет полноценной картины о влиянии солевых аэрозолей на организм, репродуктивное здоровье населения на молекулярно-клеточном уровне, прослеживаемые в поколениях.

Однако, оценить морфологические изменения репродуктивных органов на тканевом и клеточном уровне не всегда представляется возможным. А также, в период одного исследования с участием людей не получается изучить несколько поколений, в силу продолжительности такого исследования. С этими задачами хорошо справляются экспериментальные работы, в которых можно оценить обладает ли экологический фактор репродуктивной токсичностью, снижая фертильность организмов, и мутагенной активностью. Также, изучение фолликулогенеза в поколениях, безусловно, дает нам возможность получения более глубоких знаний, для решения гинекологических проблем и возможности прогнозирования репродуктивного потенциала населения.

На основе вышесказанного, нами проведено экспериментальное исследование влияния пыле-солевых аэрозолей Аральского моря на организм экспериментальных животных.

**Цель исследования:** Оценить состояние фолликулогенеза, геномной нестабильности и окислительного стресса у самок белых крыс, и их потомства при воздействии химическими загрязнителями.

**Задачи исследования**

1 Изучить фолликулогенез у самок белых крыс и их потомства при воздействии химическими загрязнителями.

2 Изучить влияние химических загрязнителей на наследственный материал самок белых крыс и их потомства на хромосомном и клеточном уровне.

3 Оценить влияние химических загрязнителей на окислительный стресс в крови и гомогенате яичников самок белых крыс и их потомства.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

– определено накопление репродуктивно-токсичных тяжелых металлов, входящих в пыле- солевые аэрозоли Аральского моря, в тканях яичников крыс при ингаляционном воздействии;

– под воздействием пыле - солевых аэрозолей Аральского моря, происходят количественные и качественные изменения фолликулярного и овариального состояний яичников. Пыле-солевые аэрозоли Аральского моря приводят к уменьшению количества первичных фолликулов и желтых тел, с усилением выраженности данных процессов в поколении;

– установлена геномная нестабильность, характеризующаяся хромосомным дисбалансом на уровне качественного и количественного показателей хромосомных aberrаций. Изучен мутагенный эффект пыле-солевых аэрозолей Аральского моря на организм самок крыс, с повышением количества клеток с микроядрами в костном мозге животных;

– выявлены разнонаправленные изменения уровня продуктов окислительной деструкции липидов, снижение активности ферментов антиоксидантной защиты, которые приводят к развитию нарушений на клеточном, органном и системном уровнях при воздействии пыле- солевых аэрозолей Аральского моря в течение 30 дней.

**Научная новизна**

Впервые проведено экспериментальное исследование с изучением влияния пыле – соевых аэрозолей Аральского моря на организм самок белых крыс и их потомства.

Впервые методом атомно-абсорбционной спектрометрии определено накопление солей тяжелых металлов, входящих в пыле – солевые аэрозоли Аральского моря в тканях яичников крыс при ингаляционном воздействии.

Впервые дана характеристика процессу фолликулогенеза при воздействии химических загрязнителей в поколениях в условиях эксперимента и установлено, что пыле – солевые аэрозоли Аральского моря приводят к значимому снижению первичных фолликулов, желтых тел, повышению количества атретичных фолликулов, а также усугублению данных процессов в поколениях.

Впервые изучено влияние химических загрязнителей на показатели окислительного стресса в гомогенате яичников у крыс и их потомства.

Впервые дана оценка влиянию пыле- солевых аэрозолей Аральского моря на геномную нестабильность на клеточном и хромосомном уровне в поколениях в условиях эксперимента.

### **Практическая значимость работы**

По материалам диссертационной работы получено свидетельство о регистрации прав авторского права №2721 от 17 ноября 2017 года «Оценка окислительного стресса в крови и тканях экспериментальных животных при воздействии пыле- соевыми аэрозолями Аральского моря» (Приложение А). Имеется внедрение в практическую деятельность:

- «Института Общественного здоровья и Профессионального здоровья», клиника профессионального здоровья «Методика проведения биохимический методов исследования тканей» (Приложение Ж).

Данное внедрения позволяет повысить навыки практикующих врачей в выполнении биохимических и цитогенетических исследований.

А также основные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс Медицинского Университета Караганды:

- кафедра морфологии и физиологии «Методика проведения структурной оценки фолликулярного состояния яичников у экспериментальных животных» (Приложение Е);

- кафедра биологии «методика цитогенетического исследования мазков костного мозга лабораторных животных» (Приложение Д).

Данные внедрения расширяют знания студентов при изучении дисциплины морфологии и физиологии, медицинской генетики, а также повышают квалификацию магистрантов при проведения научно- исследовательских работ, помогают систематизировать материал для проведения научно-исследовательских работ, позволяет расширить знания по направлению влияния экологических факторов на репродуктивную систему.

### **Апробация работы**

Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на:

- XXII Международной научной конференции «Актуальные научные исследования в современном мире» Переяслав-Хмельницкий, Украина 26-27 января 2017 года;

- на «OCC World Congress and Annual SFRR Conference Metabolic Stress and Redox Regulation» Берлин, Германия, 21-23 июня 2017 г;

- на Международной научно- практической конференции «Актуальные вопросы фундаментальной и прикладной морфологии человека и животных», посвященной 80-летию академика АМН РК, доктора медицинских наук, профессора Умбетова Туракбая Жукеновича, Актобе, 31 мая 2018 года;

- на международной конференции: Актуальные вопросы медицины труда в Казахстане «хризотил и здоровье», Караганда 1-2 ноября 2018 года;

- на XIV Конгрессе Международной Ассоциации Морфологов, Астрахань, Россия 19-22 сентября 2018 года;

– на международной конференции «The Leiden International (Bio) Medical Student Conference», Лейден, Нидерланды, 13-17 март 2019 год.

#### **Список научных трудов, опубликованных по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 5 статей и 8 тезисов на русском, казахском и английском языках. В изданиях, рекомендованных комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК 4 статьи. В изданиях, имеющих ненулевой Impact Factor и входящих в базу данных Scopus, опубликовано 2 работы, в том числе 1 статья и 1 тезис. Работа апробировалась на 7 международных конференциях, 1 республиканской конференции с международным участием. Имеется 1 свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права, 1 акт внедрение в практическое здравоохранение, 2 акта внедрения в учебный процесс.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация содержит 123 страницу машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, основной части (материалы и методы исследования, главы собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, 40 таблиц, 47 рисунков и списка литературы, включающего в себя 209 источников, 7 приложений.

# **1 ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ И ГЕНОМНУЮ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

## **1.1 Экологическая проблема Аральского моря**

Исследователи сошлись во мнении, что Аральский кризис - это глобальная экологическая проблема современности. Уже много изучено, десятки лет ученые пытаются дать объяснение тому, что происходит с этим удивительным морем. Всемирная организация ООН в 2017 году отмечает эффективные действия руководства Республики Казахстан по сохранению Арала [18].

Но этот процесс тяжело управляем, и требует больших затрат. Тяжесть и экстремальность обстановки в регионе объясняется тем, что за десятки лет от промышленных отходов, химических загрязнений, пестицидов, различных удобрений, тонны вредных веществ, стекая по рекам, впадающим в Арал, скопилось на дне моря. Теперь, вследствие высыхания Арала накопленные вещества, поднимаются со дна моря и в виде пыле-солевых аэрозолей во время ветряных бурь разносятся на десятки тысяч километров. Происходит аридизация территории, изменение климата и засоление почвы, нарушение водоснабжения населения. Ученые всего мира еще в первые годы начала падения уровня дна Аральского моря, забили тревогу и стали задаваться вопросом, о том, как это повлияет на прилегающие территории.

Проблема Аральского моря не единственная в разрезе экологических проблем земного шара. На таких материках как Африка, Америка, Австралия, также имеются озера, которые в силу антропогенного воздействия или изменения климата, стали высыхать, и оголенное дно высохшего водоема оказывает свое влияние на экосистему на тысячи километров [19, 20].

Так, например, Соленое озеро Урмия в Иране, является одним из наиболее крупных соленых озер в мире. За последние десятилетия стал резко падать уровень воды в водоеме за счет строительства больших автодорог и неравномерного распределения воды для сельского хозяйства. Тем самым, происходит подъем пыле-солевых аэрозолей с обнаженных участков дна, которые распространяются на 300 км и более. В регионе изменяется растительность, животные, которые раньше здесь обитали, теперь из-за более сурового климата не могут находиться, вода становится все более сухой с каждым годом и уменьшается количественное разнообразие рыб в озере [21, 22].

Великое Соленое Озеро на западе Северной Америки, также в результате траты приточных вод на потребительское использование стало уменьшаться, и пыле-солевые аэрозоли с осушенных берегов разносятся на сотни километров. Проведенное 2019 исследование показывает, что пыле-солевые аэрозоли совмещаясь с частицами химических загрязнителей в районах промышленности, распространяясь на сотни и тысячи километров, покрывают сельскохозяйственные поля, и являются также частью городской пыли, которую вдыхают проживающие там люди. Это пагубно влияет на здоровье населения [23].

Таких примеров изменения экосистемы очень много. Ученые даже рассматривают такое понятие, как «феномен пыльной бури» [20, р. 147; 24-26]. И пыль не всегда рассматривается как источник бед. Пылевые бури из некоторых участков планеты перенося с собой минералы, являются отличным удобрением для растительности, лесов в других уголках планеты. Так, например, пыль из Африканской пустыни Сахары является переносчиком фосфора для тропиков Амазонки [27]. Однако в составе пыли может быть множество вредных веществ, токсиканты, аллергены и др. Все это усугубляет состояние здоровья людей с проблемами дыхательной системы [28, 29].

Таким образом осушение даже небольшой части водоема, подъем пылевых бурь с пустынных регионов, обнаженной от почвы земли может приводить к нарушению экосистемы, нарушению воздуха которым мы дышим и изменению состава почвы на которой произрастают растительные продукты питания. В долгосрочной перспективе эти изменения могут привести к нарушению радиационного поля земли, к усилению засухи в засушливых районах, к наводнениям за счет увеличения осадков в районах, где оседают облака, движимые ветром [30, 31].

Распространение ветра зависит от атмосферного давления и рельефа территории и оказывает на климат огромное значение. Вместе с воздушными массами, теплом и влагой переносятся пылевые частицы. Ученые многократно совершенствовали модели переноса песка ветром, исследовали с помощью этих моделей перенос песка с осушенной части Аральского моря по территории Казахстана. Учитывая данные многолетних исследований, оценка выноса массы песка достигает 1.6 млн. т/год [9, с. 35].

Более современные данные говорят, что объем выноса пыли зависит от вида почвы. Для ранее водной, а ныне сухой части дна Аральского моря характерна высокая подверженность эрозии – до  $620 \text{ т/км}^2$  для корковых солончаков и до  $2800 \text{ т/км}^2$  для пухлых солончаков. Все это несомненно ведет к изменению состава атмосферной пыли и увеличения доли растворимых солей [32]. Главным источником перемещения песка являются пыльные бури, достигая 83% от средней многолетней массы, тогда как пыльными поземками-17% [10, р. 29-30].

Состав пыли неоднородный и в ней могут содержаться элементы, отличающиеся друг от друга по размеру, массе, поэтому процесс оседания частиц идет с неодинаковой скоростью. По законам физики, те частицы, вес и размер которых больше, раньше других покидают поток и оседают недалеко от источника их выноса. А мелкие соответственно улетают на значительные расстояния, что формирует шлейф выноса частиц с постепенно уменьшающейся концентрацией по мере удаления от очага выветривания. Эти пылевые шлейфы достаточно хорошо изображены на снимках из космоса. Изучая снимки Аральского моря, ученые пришли к выводам, что шлейфы в районе Аральского моря могут достигать нескольких сот километров, а дно этого моря это один из крупнейших источников аэрозолей в Азии.

Учитывая длительность происходящих изменений, усугубление экологической обстановки в данном регионе с течением времени, актуальность

изучения влияния факторов окружающей среды на население, проживающее в Аральском регионе, только нарастает. За последние несколько лет в Республике Казахстан проведено ряд масштабных исследований в изучении здоровья населения Аральского региона. Уровень моря неумолимо снижается, равнина реки Сырдарьи опустынивается. Общее уменьшение увлажнения территории Аральского моря, уменьшает биологическую продуктивность данного региона, что ведет к усилению континентальности его климата, большому скачку температур воздуха в зимнее и летнее время, вызывая ухудшения условия проживания в нем [33].

В пыле-солевых аэрозолях Аральского моря содержатся различные вещества, в том числе хлорорганические соединения и тяжелые металлы, которые запуская каскад патологических реакций могут по-разному влиять на организм человека [11, с. 32; 34; 35]. Токсические эффекты металлов обусловлены с следующими механизмами действия: формирование ковалентных связей с этими группами металлы, тормозящее или изменяющее активность ферментов или нарушающие целостности клеточных мембран, клеточной мишенью [36]. Мишенью так же являются биохимические процессы, органеллы клетки. В патогенезе и развитии многочисленных нозологических форм заболеваний органов в том числе репродуктивной системы существенное значение имеют неспецифические биохимические процессы, определяющие реактивность организма, его адаптивный потенциал при действии эндогенных и экзогенных факторов [37]. Результатом нарушений биохимических процессов, изменений в их каскаде, является нарушение нормальных функций клеток и тканей в организме, которое приводит к отравлению, а иногда и к гибели организма в целом [38].

Скорость поступления токсичных металлов в организм зависит не от общей концентрации металла, а от количественного содержания свободного иона. Поступление металла в организм происходит по очень быстрому механизму, в который входит абсорбция и транспорт через основные жидкости организма - кровь, лимфу и другие. Кровь - это основной переносчик всех поступающих веществ в организм, в том числе и токсических, некоторые из которых переносятся элементами крови - прежде всего эритроцитами и реже лейкоцитами. Эритроциты либо поглощают токсиканты поверхностью, либо образуют с ними связи в своей строме. Внутри красных телец они могут связываться с гемом или глобином [39]. В зависимости от вида тяжелого металла, его соединений, варьирует механизм его транспорта.

Изучение транспорта и токсического действия свинца показало, что перенос его в основном осуществляется за счет эритроцитов, а накопление в клетке за счет образования внутриядерных включений. В цитозоле имеются белки, которые инициируют образование включений свинца, конкурирующее с первичным эффектом его воздействия на эпителиальные клетки. Таким эффектом является атака на клеточную и митохондриальную мембраны [38, с. 17, 79].

Для обнаружения, определения и количественного подтверждения наличия металлов в биологических объектах, предложено множество методов, такие как атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией, оптическая эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой или плазменная атомно-эмиссионная спектрометрия, масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой и др. Спектрометрические методы анализа основаны на регистрации испускания или поглощения квантов электромагнитного излучения атомами или молекулами исследуемого вещества.

Принципиальной основой этих методов является то, что каждый атом, при энергетическом воздействии, дает характерный, присущий только ему энергетический ответ [40]. Эмиссионный спектральный анализ, пламенная фотометрия, атомно-абсорбционная спектрометрия атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой используются для диагностики отравлений «металлическими» ядами, лекарственными средствами неорганической природы, а также для определения следов металлов при огнестрельных повреждениях кожи [38, с. 17, 79; 39, с. 60-65; 40, с. 31, 35].

Для разложения биологических образцов и дальнейшего хранения используют азотную кислоту по причине простого фонового спектра. Стадия разложения пробы является определяющей. Выделяют два подхода к элементному анализу биологических объектов: с минерализацией пробы и без её разложения. Прямой анализ проб позволяет исключить появление возможных систематических погрешностей на стадии минерализации, существенно упрощает и ускоряет анализ [38, с. 21]

В настоящее время значительно возрастает актуальность изучения проблем репродуктивного здоровья, так как это является значительным звеном в политике любого государства. И так как здоровье-это важная социальная категория, которая влияет на развитие человеческих ресурсов, влиянию на него экологических факторов оказывается большое внимание.

Современные негативные тенденции в состоянии среды обитания и изменения показателей здоровья населения, на сегодняшний день приобрели особую значимость и для Казахстана [41-44]. Проведенные ранее исследования по ряду медицинских, социальных и экологических проблем региона Приаралья в основном посвящены изучению санитарно-эпидемиологической ситуации и здоровья населения только в зоне экологической катастрофы – Аральском и Казалинском районах. По данным отечественных и зарубежных ученых разработаны основные положения общей экологической репродуктологии [5, р. 20; 44, с. 24], согласно которой наиболее информативной характеристикой внешней среды являются показатели репродуктивной функции женщины, как наиболее чувствительной к воздействию неблагоприятных факторов различного происхождения.

Основными показателями репродуктивного здоровья являются способность к зачатию, рождаемость, репродуктивные потери. Бесплодный брак – это одна из самых значимых социальных и медицинских проблем в любом государстве. К

сожалению, по данным ВОЗ частота бесплодных супружеских пар не снижается из года в год и составляет в разных странах в среднем от 10 до 15 %.

Так же показателем репродуктивного здоровья можно считать временные показатели наступления менархе, раннюю или преждевременную менопаузу. По данным наших исследований у женщин, проживающих в Аральском регионе, а также в районах, граничащих с ним, наблюдается тенденция к развитию ранней или преждевременной менопаузы [17, р. 476; 45]. По данным ВОЗ ранняя или преждевременная менопауза встречается в 1-4 % случаев. Однако, по данным наших исследований в зоне экологического кризиса п. Шалкар и п. Ыргыз преждевременная менопауза встречается в 31% и 25% случаев соответственно, а диагноз ранняя менопауза был выставлен в 44% и 33% случаев. Средний возраст наступления менопаузы у жительниц Актюбинской области составил по данным наших исследований 41,5 лет [16, р. 3; 17, р. 476].

Причины развития преждевременной менопаузы еще досконально не изучены, они гетерогенны и могут быть представлены генетическими, ферментативными, аутоиммунными, инфекционно-токсическими, ятрогенными и психологическими факторами, дефектами в структурах гонадотропинов, а также их сочетанием [46, 47]. У большей части пациенток с этим диагнозом нет связи с семейным анамнезом или хромосомными аномалиями и воздействием процессов аутоиммунной природы. Есть идеи о возможном невидимом воздействии повреждающего фактора, который, не обнаруживая себя действовал вплоть до менопаузы, и, который связан с внешней средой [46, с. 212].

Частота патологии репродуктивной системы женщины отражает степень экологической и социально-экономической ситуации в регионе. Неблагоприятные экологические факторы увеличивают риск развития экстрагенитальной патологии беременности: анемий беременных, гестозов беременных, воспалительных заболеваний мочеполовой системы, венозных осложнений [48, 49].

При оценке возраста наступления менархе были получены следующие данные, диагноз позднее менархе (код МКБ-10 E 30.9), встречался в зоне экологического кризиса в 41% случаев, в зоне экологической катастрофы в 38% случаев, тогда как у населения из группы сравнения этот диагноз встречался в 12 % случаев [45, р. 271].

Осложнения во время беременности в определенной степени связаны также и с плацентарной недостаточностью, которая, в последствии приводит к гипотрофии плода, к задержке внутриутробного развития и в самом неблагоприятном и запущенном случае к антенатальной гибели плода. Эти исходы являются результатом взаимодействия системы мать – плацента – плод, причем реакция плаценты и плода в строгой зависимости от реакции материнского организма на внешние раздражители. Этими раздражителями может быть хронический стресс, отравление, интоксикация и др. [50, 51]. В результате длительного действующего неблагоприятного фактора на организм беременной женщины происходит нарушение основных функций плаценты,

таких как транспортная, трофическая, эндокринная [52]. Морфологически эти нарушения проявляются спазмом сосудов, нарушением микроциркуляции.

В литературе имеются данные о нарушении кровотока в ворсинах хориона, как о возможной причине гипотрофии плода на более поздних сроках ввиду недостаточного питания быстро растущего плода. Изменяются реологические свойства крови и, как следствие, в пуповинной крови плода сгущается кровь и нарушается газообмен [53-55].

Параллельно с этим в плаценте происходит дисбаланс в системе перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты с усилением функций первого. Результатом накопления продуктов перекисного окисления является нарушение целостности мембраны в клетках плацентарной ткани, что в свою очередь приводит к расстройству гормональной функции плаценты. Недостаточная секреция гормонов плацентарной тканью приводит к нарушению микроциркуляции в системе мать-плацента-плод, к гипотрофии плода, задержке внутриутробного развития и др. [56, 57]. Внешние повреждающие факторы очень часто действуют не изолированно, а совместно с уже существующими в организме женщины экстрагенитальными заболеваниями, что усугубляет ситуацию.

Так же имеются исследования, которые показывают, что определенные химически токсичные вещества, проходя через организм матери и проникая через плаценту в ткани плода, задерживаются там дольше, выбирая его так называемой «конечной точкой действия» [58, 59].

В Аральском регионе при выяснении паритета родов и данных перинатальных исходов нами было выявлено большое количество детей, имеющих врожденные пороки развития и генетические заболевания. Так, всего случаев рождения детей с врожденными пороками было 147, из них 64 случая (43,5%) в зоне экологической катастрофы, в зоне экологического кризиса было 59 случаев-это 40,1%, в зоне предкризисного состояния 21 случай (14,3%), в зоне с контрольной группой населения таких случаев было 3-это 2,05%. Таким образом, клинически, обращает на себя внимание большой процент случаев врожденной патологии, который не объясняется

В регионе Аральского моря показатели здоровья значительно отличаются от средних значений по стране, а именно, там отмечается высокий уровень смертности при низких показателях рождаемости. Неблагополучная экологическая ситуация и социально-значимые болезни снижают ожидаемую продолжительность жизни [60].

Нарушения репродуктивного здоровья может быть представлено следующими видами: нарушение способности к зачатию, как у женщин, так и у мужчин; нарушение способности женщин к вынашиванию плода; нарушение развития нового организма от момента зачатия до периода его полового созревания; нарушение лактационной функции у кормящих женщин; повышенная частота новообразований у потомства.

Общая заболеваемость населения изучаемого нами региона в последние годы возросла почти в 3 раза. Такой же показатель уровня врожденных

аномалий, новообразований, болезней органов дыхания и пищеварения, более чем в 2 раза возросла заболеваемость крови и кроветворных органов, эндокринной системы [61-64].

Известна высокая чувствительность репродуктивной системы женщины к воздействию неблагоприятных экологических условий. Накапливающиеся в организме чужеродные вещества, оказывают повреждающее влияние на формирование репродуктивной функции, созревание яйцеклетки.

Считается, что одни и те же антропогенные факторы могут влиять по-разному в разных климатических условиях. Некоторые из ученых предполагают, что если зачатие происходит в тяжелых климатических условиях на фоне какой-либо экологической катастрофы, то плодное яйцо погибнет или сформируются пороки развития [65].

Одним из компонентов комплексного воздействия на репродуктивную систему жителей, проживающих в Аральском регионе, являются пыле-солевые аэрозоли. В состав которых, по данным наших исследований, входят в том числе и токсичные для репродуктивной системы тяжелые металлы, являясь результатом отложения антропогенного влияния.

Известно, что недостаток естественных химических элементов в окружающей человека воде, почве, воздухе, пище способен повлечь развитие патологических состояний. Кадмий, никель, цинк, медь и многие другие микроэлементы нужны человеку в чрезвычайно малом количестве, поскольку они принимают участие в метаболических реакциях, протекающих в организме. Следствием нарушения баланса этих элементов является сбой в функционировании различных органов и др.

По данным многочисленных исследований поверхностные слои почвы благодаря своей структуре накапливают опасные для здоровья человека загрязняющие вещества, в том числе и тяжелые металлы [66-68].

Учитывая при этом оседлый образ жизни, то есть длительное пребывание человека в одной местности, необходимо обратить внимание на пролонгированное воздействие тяжелых металлов на человека. Проявляется оно в получении ощутимого вреда не одновременно с однократным поступлением большой дозы яда, а в усвоении небольших концентраций веществ в течении многих лет, приводящее к их аккумуляции в костях и органах, что грозит возникновением якобы внезапной болезни [69-71].

Имеются данные об изучении содержания тяжелых металлов в крови жителей, населяющих Аральский регион, а также в составе грудного молока [72]. Было проведено также ряд исследований в 1999 году по изучению накопления химических веществ в организме беременных женщин региона Приаралья [73]. Различные исследования показывают, что свинец оказывает отрицательное воздействие на репродуктивную систему обоих полов. Имеются данные, что уровень в крови пациенток свинца, кадмия, ртути, оказывает негативное влияние на результаты экстракорпорального оплодотворения [74-76].

По данным зарубежных исследователей сильное вредное воздействие кадмия на сперматогенез может быть связано с системной и клеточной

токсичности. Значительная отрицательная корреляция наблюдалась между уровнем сывороточного Кадмия и всех исследованных биофизических характеристик спермы, за исключением объема спермы. Положительная корреляция также наблюдалась между содержанием кадмия в сыворотке и уровнем фолликулостимулирующего гормона [76, р. 509]. Также имеются данные о влиянии кадмия и ртути на репродуктивную функцию женщин. Изучая Аральский регион, отмечается большая заболеваемость в целом, чем в других районах Казахстана.

## **1.2 Фолликулогенез и фолликулярный запас яичника в норме и патологии**

Изучение репродуктивного потенциала населения складывается из изучения репродуктивной функции женского и мужского населения конкретного региона. Внимание к теории репродукции любого вида берет свое начало со времен зарождения человечества. Известное высказывание «ex ovo omnia» - «все происходит из яйца» - Уильма Харви, показывает нам, что основным объектом изучения процессов размножения с точки зрения ученых прошлых тысячелетий, была яйцеклетка [77].

Известно, что оплодотворение возможно благодаря слиянию половых клеток, одной из которых является женская половая клетка, заключенная в фолликул [77, с. 32, 127]. Само по себе понятие репродуктивный потенциал включает в себя способность популяции к росту при оптимальных условиях в стабильном возрастном составе. Следовательно, на репродуктивный потенциал напрямую оказывает влияние состояние фолликулярного запаса и процесса фолликулогенеза в целом.

В настоящее время большой интерес вызывает гетерогенность периода репродуктивного здоровья женщин. При том, что в регионах с неблагоприятными природными условиями отмечается системная тенденция к более позднему менархе и ранней менопаузе [16, р. 3; 17, р. 475-476; 45, р. 271]. Некоторые авторы считают, что загрязнители окружающей среды являются одним из этиологических факторов преждевременного истощения яичников [5, р. 21; 6, р. 234; 7, р. 255].

Фолликулогенез – это сложный и многоэтапный процесс, предшествующий овуляции. Его можно рассматривать как системный стадийно - специфический процесс, отражающего состояние репродуктивной функции женского населения. Овуляция представляет собой разрушение целостности фолликула и выхода из него зрелой яйцеклетки, которая готова к оплодотворению. Регулярное прослеживание и контроль фолликулогенеза даст возможность практикующему врачу репродуктологу определить наиболее удачные дни для зачатия дни для зачатия ребенка или возможные причины бесплодия.

Понятие фолликулогенез это непрерывное, с момента полового развития и до угасания репродуктивной функции, развитие клеток, которые при созревании дают начало ооциту- женской половой клетке.

К периоду полового созревания женские особи подходят с определенным количеством незрелых фолликулов, число которых заложено еще внутриутробно, и обусловлено рядом факторов, таких как генетическая предрасположенность, внешнее воздействие на организм беременной женщины. В отличие от сперматогенеза, оогенез прекращает свое существование, когда клетки перестают реагировать на поступление стимулирующих их рост гормонов, перестают расти, это свидетельствует о наступлении менопаузы.

У людей и грызунов эмбриональные предшественники гамет известны как первичные зародышевые клетки [78], которые в начале эмбрионального развития мигрируют в область, где генитальный гребень будет формироваться примерно через 5 и 6 недель развития человека [79].

В сроке 7-9 недель начинается развитие яичника (называемого префолликулярной стадией) и зародышевые клетки (оогония) и клетки гранулезы обычно располагаются в пуповинах и листах без определенной организации [80]. Оогонии несколько раз делятся, превращаясь в ооциты, и затем вступают в мейоз. Эта стадия соответствует 11-12 неделям беременности и продолжается во втором триместре [81].

Существуют противоречивые данные в отношении начала фолликулогенеза, то есть возникновения первичных фолликулов, которые, как сообщалось, имеют место между 16 и 21 неделями беременности [82].

Первичные фолликулы представляют собой резерв половых клеток на всю репродуктивную жизнь женщины. Большинство первичных фолликулов останутся бездействующими долгое время, однако часть из них начнет расти и образует пул фолликулов. Раннее, внутриутробное развитие фолликула важно, так как оно регулирует размер первичного пула фолликулов в покое и судьбу фолликулов, что, в свою очередь, влияет на фертильность и продолжительность репродуктивной жизни. Механизм, который лежит в основе выбора определенных фолликулов для роста и прогрессирования, до настоящего времени полностью не изучен.

В литературе имеются данные, которые говорят, что судьба каждого конкретного фолликула, зависит от взаимодействия противоположных факторов: способствующих росту и пролиферации, и факторов, способствующих апоптозу [83]. Возможно, рост фолликулов зависит от внутриорганных процессов и внешних воздействий. До настоящего времени было практически невозможным изучение процессов фолликулогенеза в антенатальном периоде, однако исследования последних лет дают нам возможность заглянуть в механизм регуляции раннего развития фолликулогенеза.

Для изучения механизма развития первичного фолликула ученые дали оценку дифференцировки и пролиферации половых клеток в женских половых железах, полученных от плодов на этапе развития 2-го и 3-го триместра, а также доношенных новорожденных плодов с помощью иммуногистохимии [84]. В изученной литературе, авторы выделяют 2 типа клеток, первые- зародышевые, которые обнаруживаются в коре яичников и выделяются до 22 – 24 недель беременности, демонстрируют незрелый фенотип и являются митотически

активными. Второй тип клеток- обнаруживается в мозговом веществе, уже не размножается, а подвергается только дальнейшему созреванию.

В более свежей работе Агнесс Бонно и др. 2013 г., имеются данные о прямой зависимости раннего развития ооцитов от экспрессии генов и специфических молекулярных механизмов для каждого типа клеток [85]. Это большой шаг в изучении раннего антенатального фолликулогенеза, однако, до настоящего времени такие исследования проводились только на экспериментальных моделях овулирующих млекопитающих. Для изучения данного процесса у человека, необходимо накопить более обширную базу об экспрессии генов яйцниками.

В последнее время рассматривается вопрос об теории наличия в яйчниках стволовых, зародышевых клеток [86]. По этой теории, первичные зародышевые, будущие половые клетки, мигрируют в гонады и в последующем дают начало первичным фолликулам.

И так, новорожденная девочка появляется на свет с определенным количеством первичных фолликулов, которые находятся в стадии первой мейотической профазы пока не войдут в стадию роста. Как уже говорилось, с возникновением первичного пула, началом полового созревания и до 50-55 лет происходит непрерывное развитие фолликулов. На сегодняшний момент, объединяя результаты всех современных данных, мы имеем более-менее четкое представление о развития антрального фолликула в течении менструального цикла [87, 88]. Гистологический метод включает в себя морфологический подсчет первичных фолликулов, для выдачи заключения о возможном репродуктивном потенциале. В мировом научном сообществе до сих пор остается открытым вопрос о возможности восстановления первичного количества фолликулов после воздействия, каким-либо физико-химическим фактором через определенное время. Так, в исследовании Джонсона и др. 2005 г., восстановление первичного количества фолликулов у мыши произошло через 24- 36 часов [89].

Однако, в исследовании других авторов эта гипотеза не находит подтверждения [90]. И наоборот, имеется ряд работ, в которых отмечается резкий спад количества первичных фолликулов после воздействия экзогенных факторов, в плоть до уровня менопаузы. Suh E. и другие в своем исследовании 2008 года, отмечают, что изоформа трансактивации р63 имеет важное значение в процессе разрушения ооцитов, вызванного повреждением ДНК [91].

Следовательно, возникает вопрос о степени повреждения ДНК первичных ооцитов при воздействии внешних воздействий на женский организм и эффект, который это может оказать на оплодотворяющую способность пожилых ооцитов и их содержание в яйчнике.

Эндокринологический метод оценки репродуктивности и процесса фолликулогенеза включает в себя изучение уровня гормонов в крови пациентки в различные дни менструального цикла. Так, например, гормон эстроген является синонимом рождаемости и бесплодия. Развитие полового тракта так же зависит от уровня эстрогена в крови. Финдлей Ж.К. в 2009 году дает заключение,

что эстроген необходим для нормального фолликулогенеза после антральной стадии [92].

Таким образом, фолликулогенез как в антенатальном, так и постнатальном периодах является динамической и стадийно - специфическим процессом, который направлен на формирование и поддержание фолликулярного запаса яичника.

К неинвазивным методам оценки фолликулогенеза относятся инструментальные методы, такие как ультрасонография. Последовательное ультразвуковое исследование органов малого таза дает возможность врачу гинекологу дать ответ на наличие или отсутствие в данном менструальном цикле доминирующего фолликула, его овуляцию и дальнейшую регрессию. Врач может охарактеризовать доминирующий фолликул, измерив его диаметр, толщину стенки фолликула и зафиксировать факт овуляции обнаружив наличие свободной жидкости в позадиматочном пространстве, а также дать оценку кровоснабжения яичника и фолликула, в частности.

Таким образом, измерив объем яичника, количество антральных фолликулов, врач может дать косвенную оценку фолликулярному запасу. Фолликулярный запас или овариальный резерв, это показатель индивидуального запаса яйцеклеток у каждой женщины, запас фолликулов, находящихся в состоянии покоя. Этот резерв формируется во время окончательного гистогенеза, последней фазы органогенеза яичников, процесс фолликулогенеза или гистогенеза фолликула: сборка первичных ооцитов дипотена и соматических прегранулезных клеток в первичные фолликулы (ПФ). В яичниках млекопитающих фолликулогенез происходит до рождения или вскоре после этого [93, 94].

Следовательно, мы можем сделать заключение, что наиболее объективное определение фолликулярного запаса - это качественная и количественная характеристика примордиальных фолликулов и не всех фолликулов, которые видно при УЗИ исследовании.

Исходя из этого, учеными стали изучаться другие методы исследования данного феномена. Кроме ультразвукового метода, оценку этому показателю можно дать, узнав уровень Анти-мюллера гормона. АМГ продолжает экспрессироваться в растущих фолликулах клетками гранулезы до тех пор, пока они не достигнут размера и состояния дифференцировки, при котором они должны выбираться для доминирования.

У людей это происходит на антральной стадии, когда размер фолликула составляет 4-6 мм. Когда фиксируется снижение уровня этого гормона, можно говорить о снижении овариального резерва. Уровень АМГ становится не обнаружимым за 4-5 лет до наступления менопаузы. Этот гормон интересен еще и тем, что его уровень не регулируется уровнем гонадотропинов [94, p. 57; 95].

У ооцита млекопитающих, есть хорошо выработанный механизм защиты. Функцию защитника выполняет гематоовариальный барьер, который отделяет ооцит от воздействия иммунной системы, и состоит из нескольких слоев:

внутренняя тека, базальная мембрана фолликулярных клеток, фолликулярные клетки, и Zona Pellucida.

Однако, несмотря на такую защиту, все же имеются экзогенные и эндогенные факторы, способные повредить ооцит, тем самым нанести вред гормональной регуляции организма женской особи и будущему потомству. Поэтому в литературе оказывается особое внимание влиянию химических загрязнителей на репродуктивную систему. В настоящее время, благодаря имеющимся данным о строении функции яичника, мы можем с помощью морфологического анализа, дать оценку влияния того или иного фактора на женскую репродуктивную систему.

Химическое загрязнение окружающей среды формируется в результате изменения ее естественных химических свойств, которое может происходить в результате поступления в окружающую среду химических веществ в концентрациях больше допустимых или несвойственных для данного региона.

Химические загрязнители могут попадать в организм животного и человека напрямую, с водой, ингаляционно при вдыхании. А также попадание вредных химических веществ в организм может происходить опосредовано, через пищу, например, растения, которые выращены в экологически неблагоприятных местах, или рыба, которая выросла в загрязненных человеком озерах или реках. И, наконец, мясо животных, которым либо специально добавляют в пищу химические добавки для ускорения роста или набора массы, либо они сами питаются растительной пищей, произрастающей на загрязненной почве.

Таким образом, из-за нерационального землепользования, земледелия и животноводства, человек своими руками совершенствует ряд возможных путей поступления химических загрязнителей в организм.

К химическим загрязнителям можно отнести разные вещества, от тяжелых металлов, до органических соединений, источниками которых являются промышленные предприятия, сельскохозяйственные производства и транспорт. Часто ксенобиотики, в частности тяжелые металлы, существуют в природе как различные смеси и взаимодействующие комплексы. От такого разнообразия эффекты влияния на организм в целом очень разнятся в зависимости от большого количества факторов. В последнее время выделяют даже группу – репродуктивных токсикантов. К репродуктивно токсичным тяжелым металлам относят свинец, ртуть, кадмий, медь.

В 2010 году Nandi S. изучая влияния тяжелых металлов на развитие ооцитов буйвола и развитие *in vitro*, показал, что кадмий и свинец оказывают дозозависимое влияние на жизнеспособность, морфологические аномалии, созревание, расщепление и выход бластоцисты [96]. Блок развития, дегенерация и асинхронные деления были выше у эмбрионов, подвергнутых воздействию кадмия, чем свинца.

Имеются также работы по изучению влияния кадмия на сперматогенез, ухудшению результатов оплодотворения *in vitro*. В одной из таких работ изучается хроническая или «фоновая» интоксикация ртутью, кадмием и свинцом, связанная с привычками употребления в пищу морепродуктов и рыбы,

которая часто в себе несет токсическую нагрузку, а также, связь концентрации этих тяжелых металлов на исход методов экстракорпорального оплодотворения [97].

Авторы выводят ряд гипотез, что поскольку отмечается коррелирующая взаимосвязь между концентрацией в крови у женщин свинца и количественные и качественные показатели созревания ооцитов в процедуре ЭКО, а кадмий может играть важную роль в процедуре оплодотворения ооцитов во время ЭКО. В более поздней своей работе 2012 года, авторы находят связь между концентрацией токсичных металлов в фолликулярной жидкости и результатами оплодотворения *in vitro*. В работе Aldo Cavallini и других авторов 2016 года описываются данные о накоплении тяжелых металлов в фолликулярной жидкости фолликулов, полученных при экстракорпоральном оплодотворении у женщин, проживающих в области, на которую оказывалось влияние промышленной деятельности, обработка отходов [98]. Ученые делают вывод о том, что снижение продукции эстрадиола и количества зрелых ооцитов может быть связано с хроническим воздействием таких тяжелых металлов как хром и свинец [99].

В другом источнике изучалось влияние интоксикации кадмием во время беременности на репродуктивную функцию потомства. Авторы приходят к выводу, что интоксикация кадмием может приводить к перестройке процессов стероидогенеза и, как следствие, преждевременному половому развитию, происходит изменение толщины эндометрия в результате гиперэстрогемии, а также эти эффекты могут иметь долгосрочные последствия за пределами одного поколения [5, p. 21-22].

Есть ряд работ, в которых описывается токсическое влияние свинца на репродуктивную систему как мужского организма, так и женского; снижение количества подвижных сперматозоидов нежизнеспособных сперматозоидов, увеличение количества сперматозоидов с патологии головки, то самой части сперматозоида в которой несетя генетический материал.

В экспертном обзоре 2016 года Полин Вабр и др. было проанализировано ряд работ за период 2000-2016 год и отобрано 97 работ. По результатам проведенного исследования авторы анализа пришли к выводу, что загрязнение окружающей среды вероятно являются причиной преждевременного истощения яичников, основным механизмом этого является увеличение количества атрезированных фолликулов [5, p. 22].

Одним из этапов фолликулогенеза является образование желтого тела, следовательно, логично предположить, что если какие-то экотоксиканты могут оказывать влияние на фолликулогенез на стадиях развития от примордиального до третичного фолликула, то какое-то воздействие будет возможно оказываться и на развитие желтого тела и его функциональную способность.

Одной из причин репродуктивных потерь в настоящее время считается недостаточность лютеиновой фазы, которая может возникать из-за ложной недостаточности, то есть нечувствительности рецепторов эндометрия к прогестерону при достаточных его значениях, и истинной, когда в желтом теле

на самом деле производится пониженное количество прогестерона лютеоцитами.

Причиной недостаточной выработки прогестерона лютеоцитами могут быть перестройки в органеллах клетки, их разрушение, ранний или преждевременный лютеолизис при атрезии желтого тела. Каким образом происходят эти нарушения на молекулярно – клеточном уровне еще предстоит разобраться. Возможно, под действием внешних факторов таких как хронический стресс, воспалительные процессы, воздействие химических загрязнителей приводят к нарушению трофики этого временного эндокринного органа, и как следствие нарушается структурная архитектура его морфологической единицы-лютеоцита.

В последнее время встречается ряд работ, в которых изучается роль воздействия химических загрязнителей, экотоксикантов на функцию желтого тела. При повышении в сыворотке крови тяжелых металлов кадмий и свинец, и снижении необходимых человеку микроэлементов, таких как селен, медь, цинк, способствует повторному спонтанному аборту [100].

Таким образом, снижение фолликулярного запаса и нарушение фолликулогенеза является системным процессом репродуктивной функции или это локо-региональный процесс в яичниках в результате воздействия различных факторов (физических, химических, биологических и т.д.)?

Фолликулогенез является сложным многоэтапным физиологическим и динамическим процессом, отражающим репродуктивную функцию женского организма. Фолликулярный запас является статическим срезом во временно-пространственном отношении, отражающим количественное и качественное состояние фолликулов различного типа.

В настоящее время методы оценки фолликулярного запаса и их спектр очень скудные и представлены биохимическим (АМГ) и УЗИ и т.д. Однако, УЗИ не является, по нашему мнению, на основании представленной литературы объективным методом отражения фолликулярного запаса.

В перспективе требуются новые научно-прикладные исследования, которые позволят выявить новые инструментальные и биохимические маркеры для полноценной оценки фолликулярного запаса. Это позволит стратифицировать популяцию женщин фертильного возраста с репродуктивной недостаточностью для более адекватного выбора ассистированной репродуктивной помощи.

Изучение фолликулогенеза и фолликулярного запаса в эксперименте под действием комплексного экологического фактора позволяет идентифицировать и определить новые этиопатогенетические механизмы нарушения репродуктивной функции в целом, а также дает нам возможность оценить репродуктивный потенциал женского населения проживающего на территории этого экологического ареала.

Также остается спекулятивным вопрос: снижение фолликулярного запаса яичника является отражением дефективного фолликулогенеза, который мог произойти в перинатальном периоде? Второе, снижение фолликулярного запаса яичников под действием экзогенных факторов является вторичным процессом

как следствие системного нарушения работы гипоталамо-гипофизарной системы или все же это локо-региональный процесс повреждения стволовых половых клеток?

Для ответа на данные вопросы требуются дальнейшие научные исследования в перспективе. Но мы полагаем, что на основании проведенного литературного анализа, снижение фолликулярного запаса под воздействием химических и физических факторов может быть связано как с первичным воздействием на прогениторные половые клетки, так и системно на центральные органы, регулирующие процесс фолликулогенеза.

### **1.3 Влияние химических факторов на наследственный материал**

Влияние комплекса экологического фактора и антропогенных загрязнений, генетически активных веществ – мутагенов на организм. То есть, изменения в организме человека, проживающего в районе Аральского моря, стоит рассматривать не только как последствия влияния тяжелых металлов, но как результат комплексного, еще достаточно неизученного воздействия пыле-солевых аэрозолей. Возможно, происходит не только нарушение жизнедеятельности населения, проживающего в нем, но и незаметное глазу возникновение мутаций, которые отрицательно влияют на жизнеспособность человека. В мировой литературе имеются данные, что более 30 % эмбрионов погибает до рождения из-за наличия генетических дефектов несовместимых с жизнью. К этой же группе относятся пациентки с повторяющимися выкидышами в анамнезе, неразвивающимися беременностями и рождением детей с множественными пороками развития. Вопрос о связи хромосомных aberrаций и репродуктивных потерь еще изучается, но уже известно, что изменение околоцентромерного гетерохроматина является причиной привычного невынашивания, спонтанных аборт [101]. Это, прежде всего, связано с тем, что при определении предельно-допустимой концентрации многих химических веществ, в том числе и тяжелых металлов, пестицидов мутагенная активность не учитывалась. Мутагенный эффект пыле - солевых аэрозолей Аральского моря не изучался как фактор геномной нестабильности. Хотя в ряде экспериментальных работ описываются генотоксические эффекты воздействия тяжелых металлов. Kasuba, Vilena and an. (2002) описывают генотоксическое действие хлорида кадмия на организм крыс путем повышения количества микроядер в периферической крови у затравленных животных [102]. Кадмий способен проникать в организм человека через потребление загрязненных продуктов, вдыхание сигаретного дыма, неправильное обращение с самим металлом и питье воды, загрязненной кадмием. Следует отметить, что воздействие кадмия также может происходить в основном через растения, которые накапливают металл из почвы, загрязненной обогащенными кадмием удобрениями, оросительной водой, содержащей кадмий, и выпадением кадмия из воздуха (Olympio et al. 2018). Muwaffak Alosman et al. 2019 отмечают, что основным механизмом токсического действия солей кадмия является нарушение механизма восстановления дезоксирибонуклеиновой кислоты, стимуляция гибели клеток и

производство активных форм кислорода. Кроме того, токсичность кадмия связана с его стимуляцией к образованию воспалительных цитокинов и снижением защитной роли образования оксида азота [103-105].

Формирование морфологических структур эмбриона - так называемый эмбриональный морфогенез - осуществляется при тесном взаимодействии генома зародыша и организма матери, особенно ее гормональной и иммунной систем, и связан с процессами размножения, роста, миграции, дифференциации и отмирания клеток. В основе этих процессов лежит последовательное декодирование морфогенетической информации зародыша, обеспечивающее дифференциальную активность генов. Нарушение любого звена морфогенеза под воздействием генетических или средовых факторов может реализоваться во врожденный порок. Экзогенно обусловленные ВПР возникают в результате воздействия тератогенных факторов во время беременности на эмбрион, плод. Тератогенные факторы по аналогии с мутагенными (в зависимости от источника воздействия) подразделяют на 1) физические, 2) химические и 3) биологические. Они не вызывают стойких изменений генетического аппарата.

Периоды, когда плод наиболее подвержен повреждающему действию тератогенных факторов, называют критическими. Широко применяемые в промышленности, сельском хозяйстве и быту бензин, бензол, фенолы, формальдегид, ядохимикаты, свинец, пары ртути, различные краски обладают эмбриотоксическими свойствами. Их воздействие может вызвать самопроизвольный выкидыш, внутриутробную гибель плода.

Однако, геном всех клеток защищен особым механизмом репаративной активности ДНК, которая особенно важна в критические периоды развития, то есть в период оплодотворения и в самом начале эмбрионального развития. ДНК в раннем развитии имеет материнское происхождение, и поэтому транскрипты, сохраняемые во время созревания, должны контролировать целостность хроматина, до перехода в зиготу на стадии 4-8 клеток в эмбрионе человека. Большинство повреждений ДНК происходит из-за апоптоза или активных форм кислорода. Повреждение ДНК сперматозоидов под действием окислительного стресса достаточно полно представлена в научной литературе [106, 107] и модификаторов ДНК [108, 109]. Доказано, что сперматозоиды с поврежденной ДНК могут быть причиной мужского бесплодия или достигать места оплодотворения и передавать мутации [108, p. 122]. Однако изучить влияние окислительного стресса на ооциты человека проблематично. Хотя считается, что материнский геном хорошо защищен в зрелом фолликуле; Zenzes et al., 1998 в своей работе указывает на возможность повреждения материнского генома в период длительного покоя до повторной активации мейоза. В более свежей литературе указывается на возможность повреждения ооцита под действием окислительного стресса на последних стадиях роста. Эмбрион же имеет активную защиту от окислительного стресса в окружающей среде, это необходимо для прохождения по маточным трубам без повреждений [110].

Гипоксия как фактор развития пороков у новорожденных может вызывать нарушение плацентации, недоразвитие плода, его гибель. Неполноценное

питание во время беременности как причина дефицита микроэлементов цинка, марганца, магния может привести к развитию пороков ЦНС [47, с. 577]. В экспериментах с млекопитающими обнаружена способность смесей солей металлов вызывать мутагенный эффект в соматических клетках и гаметях, а также угнетать защитные силы организма. При сопоставлении клинико-эпидемиологических показателей здоровья беременных женщин и детей с мутагенными и токсикогенными эффектами исследуемых солей тяжелых металлов, обнаружена корреляция эффектов в соматических и генеративных клетках с врожденными пороками развития и гипоксией [109, р. 11-12]. В научной литературе есть работы, где выявлена взаимосвязь между наличием цитогенетических аномалий в периферической крови животных и большее высоким уровнем ответной реакции на введение гонадотропинов и получением большего количества эмбрионов, что в итоге может привести к накоплению генетического груза и передаче нарушенного генетического материала поколениям [100, р. 155, 157].

В недавно проведенной масштабной работе по проведению клинико-функциональных исследований здоровья населения Приаралья было дано заключение особенностей иммунной, эндокринной и репродуктивной систем населения. Однако, когда мы изучаем Аральский регион, проведя множество клинических исследований женщин репродуктивного возраста и получив определенные результаты, остается открытым вопрос, как влияют экологические, антропогенные факторы непосредственно на органы репродуктивной системы, на яичники, механизм фолликулогенеза, на репродуктивный потенциал в поколениях, на маточно - плацентарный комплекс, на геномную нестабильность. Эти вопросы несут в себе большую медико-социальную проблему, не только для Республики Казахстан, но и для мирового сообщества. Масштабность экологического бедствия в Приаралье требует настоящего продолжения работ по их изучению и решению.

#### **1.4 Влияние химических загрязнителей на продукты липоперекисного каскада**

Химические загрязнители включают в себя группу веществ, которые попадают в окружающую среду или естественным путем, или в результате деятельности человека [111]. По своей природе могут быть органическими, (например, нефтепродукты), неорганическими (тяжелые металлы) и пестициды, которые по своей природе могут быть органическими и неорганическими [112]. Интерес к токсикологии растет в последнее время в связи с развитием химической промышленности и синтезом все более новых соединений [113].

Все химические загрязнители могут оказывать разнонаправленное действие на живые организмы в зависимости от своего состава, концентрации и путей попадания в организм. Так, например, ряд физиологических процессов в организме человека происходит с участием химических элементов и даже тяжелых металлов. Железо, цинк, кальций, магний необходимы для межклеточного взаимодействия. Однако количество или концентрации этих

химических элементов в живом организме в норме незначительны. И если под действием каких – либо факторов происходит накопление вышеназванных элементов в составе химических соединений, то могут произойти метаболические нарушения функций жизнедеятельности на молекулярном, клеточном, органном, организменном уровнях. Еще в 1968 году Скоблин А.П. показал, что избыточное накопление цинка приводит к нарушению развития скелета у животных, за счет снижения концентрации кальция и фосфора, а также за счет угнетения активности ферментов, участвующих в синтезе коллагена в остеобластах [114].

Еще одним показательным примером может служить влияние ионов железа на организм. Молекулы железа являются основным компонентом гемоглобина и участвуют в эритропоэзе в костном мозге [115]. Однако, из-за отсутствия в организме активных механизмов выведения железа, этот тяжелый металл легко накапливается при определенных ситуациях и вызывает повреждения в печени, сердце, щитовидной железе и ЦНС [116]. При перегрузке железом в клетках происходит накопление продуктов окислительного стресса таких, как малоновый диальдегид и другие, под действием которых происходит длительное токсичное действие на клетку и развитие гибели клетки, фиброза тканей [115, р. 1989; 116, р. 9; 117; 118].

Так как химические загрязнители попадают в окружающую среду и привлекают свое внимание с точки зрения результатов их воздействия на живой организм, и которые сильно изменяют экологическую обстановку, а также влияют на климатические условия с течением времени на территории регионов. Так, например, Аральское море является ярчайшим примером экологической катастрофы нескольких десятилетий конца 20-го и начала 21 века.

Распространенность в окружающей среде таких химических веществ, как тяжелые металлы, и, частота и разнообразие результатов их воздействий на живые организмы заставляет задуматься о механизмах, в результате которых возникают нарушения в клетках растений, животных и человека. Тяжелые металлы в организм человека и животного могут попадать различными способами: через вдыхаемый воздух, с водой и продуктами питания, производимой на данной территории (регионе) или сельскохозяйственной продукцией. В литературе широко описаны исследования о накоплении тяжелых металлов в крови, молоке, шерсти, костях животных, проживающих на неблагоприятных территориях [119-121].

Изучается воздействие отдельных тяжелых металлов на различные системы организма животных и человека [122-124]. Известно, что вдыхание паров соединений тяжелых металлов при промышленном производстве может приводить к развитию хронической обструктивной болезни легких, бронхиальной астме [125]. Ингаляционное воздействие тяжелых металлов поступающих из окружающей среды в организм оказывает влияние и на развитие плаценты у беременных, на состояние организма в целом [66, р. 1064; 67, р. 17; 68, р. 6-7; 69, с. 18; 70, с. 145; 71, с. 61].

В 2017 году Yen-Chih Lin, Ie-Bin Lian и др. провели перекрестный анализ корреляционной взаимосвязи концентрации содержания тяжелых металлов в почве с развитием жирового гепатоза печени у мужчин. Они показали, что высокое содержание таких металлов, как мышьяк, ртуть, кадмий, хром, медь, никель, свинец и цинк является значительным фактором развития данной патологии печени [126].

Пыле – солевые аэрозоли Аральского моря – это сложная смесь химических веществ, таких как пестициды, ксенобиотики, соли тяжелых металлов [9, с. 28-29; 33, с. 28-32; 35, с. 127]. Все эти компоненты появились на дне Аральского моря в результате антропогенного воздействия: продукты развития сельскохозяйственной и тяжелой промышленности [35, с. 127; 63, с. 18; 71, с. 61; 72, с. 118; 127]. Терешкевич Д.П. в своей работе 2011 года показал эпидемиологические аспекты здоровья населения, проживающего в Аральском регионе [49, с. 19]. Он указал на возможные изменения состояния здоровья человека, проживающего в зоне экологической катастрофы.

Данные о том, что отравление тяжелыми металлами могут проявляться канцерогенностью, нейротоксичностью, мутагенностью, широко известны. Однако, изучение механизма развития этих процессов изучается до настоящего времени. Это подтверждают исследования последних лет, которые показывают, что под воздействием одного тяжелого металла или смеси тяжелых металлов при вдыхании или при попадании в организм с водой развивается патологический процесс, получивший название окислительный стресс [113, р. 257; 128].

Механизму развития окислительного стресса уделяется большое внимание. Достаточно данных накопилось о влиянии экологического неблагополучия, облучения, радиации, вредных привычек на развитие и накопление продуктов окислительных реакций в организме [128, с. 12; 129; 130; 131; 132].

В результате чрезмерного накопления свободных радикалов, полученных из кислорода, развивается окислительный стресс. Свободные радикалы могут образовываться внутри клетки, или, во внеклеточном пространстве, взаимодействуя при этом с липидами на мембране клеток, нуклеиновыми кислотами, углеводами и белками [133].

Широкая распространенность процессов перекисного окисления липидов в организме связано с тем, что молекулы кислорода присоединяются к ненасыщенным жирным кислотам, которые входят в состав биологических мембран клеток нашего организма. В нормальных условиях организм поддерживает баланс между окислителями и антиоксидантной защитой. Если под действием свободных радикалов происходит разрыв полиненасыщенных жирных кислот, то образуются альдегиды, в том числе малоновый альдегид, который связывает белковые аминокислоты. Об активации процессов свободнорадикального окисления можно судить именно по наличию в крови и тканях организма малонового диальдегида (МДА), который является неблагоприятным признаком и указывает на скрытую или явную интоксикацию [134, 135].

Если равновесие между перекисным окислением липидов и антиоксидантной защитой нарушено, или последняя недостаточно эффективна, то происходит нарушение целостности клеточных мембран во всех тканях организма [136]. Накоплено достаточно материала, о связи различных травм, системных или инфекционных заболеваний с окислительным стрессом, влияния радио магнитных волн, радиации.

Для установления механизма нарушения функции органа или системы под воздействием различных экологических факторов, проведено ряд экспериментальных работ, указывающих на нарушение окислительного метаболизма в клетках определенных тканях организма животных под воздействием того или иного неблагоприятного фактора. Так М. Lenarzyk в 2009 году показал развитие окислительного стресса в почках у крыс под воздействием хронического ионизированного облучения [135, р. 166]. Migliaccio V. в апреле 2019 года показал развитие окислительного стресса, и, как следствие, стеатогепатита у экспериментальных животных под воздействием ксенобиотиков [137].

Так же, по данным литературы, имеется ряд работ по изучению развития окислительного стресса в тканях репродуктивной системы в эксперименте у животных. Так под действием электромагнитных волн развивается окислительный стресс, приводящий к гистопатологическим изменениям в тканях яичников и матки у крыс [138]. Сам окислительный стресс, влияя на беременный организм животных, способен вызывать изменения в структуре плаценты и оказывать влияние на перинатальные исходы и количество приплода у животных [139].

Однако, несмотря на большое количество работ по изучению окислительного стресса в органах репродуктивной системы женских особей животных, все же, степень влияния различных факторов на репродуктивную систему посредством окислительного стресса больше представлено в работах по изучению мужской репродуктивной системы. Так, в работах [140-142] представлены результаты изучения влияния отдельных тяжелых металлов на уровень окислительного стресса в семенниках животных. В данных работах описывается механизм развития бесплодия у особей мужского пола, подвергнутых интоксикации таких тяжелых металлов как никель, кадмий, свинец, а также алюминий, индий и другие. Окислительный стресс, развиваясь, вызывает морфологические изменения в яичках животных в форме отека, застоя и некроза. Впоследствии данные нарушения приводят к снижению фертильной способности и бесплодию особи.

Физико-химические факторы вызывают развитие окислительного стресса в сперматозоидах у экспериментальных животных, и приводят к накоплению продуктов липоперекисного каскада, снижению активности ферментов антиоксидантной защиты, которые, в свою очередь, вызывают морфологические нарушения в стадии морфо-дифференцировки сперматозоидов у крыс. А также накопление вторичных продуктов липоперекисного каскада и снижения активности ферментов антиоксидантной защиты и ферментов пуринового

обмена, сопровождается глубоким отклонением от нормы подвижности сперматозоидов, повышением неподвижных сперматозоидов [14, с. 32; 15, с. 40; 143; 144].

При проведении клинических исследований в ходе НТП «Комплексные подходы в управлении состоянием здоровья населения Приаралья» научными работниками изучено снижение продуктов липоперикисного каскада и активности ферментов антиоксидантной защиты, морфо-дифференцировки сперматозоидов у мужчин, проживающих в регионе Приаралья [61, р. 15]. В ходе изучения комплексного влияния пыли – солевых аэрозолей Аральского моря на репродуктивную систему, было проведено ряд экспериментальных работ с изучением изменений в мужской репродуктивной системе. Окасов Д.Б. с соавторами показывает, что при ингаляционном воздействии пыли-солевыми аэрозолями Аральского моря в течение 60 дней происходит развитие стойкого окислительного стресса, истощение антиоксидантной защиты в сперматозоидах крыс [62, р. 120]. Автор предполагает, что это является пусковым механизмом развития репродуктивной дисфункции мужской особи.

Считается, что продукты перекисного окисления, или, если быть точным, то свободные радикалы модифицируют модифицирует липиды и жирные кислоты в мембранах сперматозоидов. Эти модифицированные побочные продукты в значительной степени влияют на жизнеспособность и общее качество репродуктивных клеток, увеличивая вероятность бесплодия. Как и сперматозоиды, ооциты содержат большое количество липидов, которые могут быть затронутыми свободно радикальным окислением. В 2015 году Lord T. и др. показали, что после овуляции, в стадии метафазы II (МII), ооцит испытывает перепроизводство активных форм кислорода и повышенные уровни перекисного окисления липидов. Происходит накопление МДА и альдегиды 4-гидроксиноненал. Воздействие повышенных уровней этих альдегидов вызывает образование митохондриальных активных форм кислорода, перекисное окисление липидов, потерю потенциала митохондриальной мембраны и возможный апоптоз в ооците МII [93, р. 46].

Медиаторы окислительного стресса нарушают внутриклеточные процессы и целостность ДНК, что приводит к бесплодию и неблагоприятным репродуктивным результатам. Радикал-зависимое связывание на окружающие макромолекулы вызывает цепочку реакций, которые могут вызвать повреждение митохондрий, активацию каспазы и апоптоз. Это клеточное повреждение влияет на структуру ДНК в ооцитах и сперматозоидах, приводящих к аддуктам ДНК, окисление, дезаминирование и места распада. Из-за воздействия радиации, экологических факторов, таких как тяжелые металлы и курение, а также собственные окислительные процессы, происходит повреждение ДНК [6, р. 234]. Опосредованное окислительным стрессом повреждение ДНК стимулирует пути восстановления ДНК, такие как прямое восстановление повреждения, восстановление одноцепочечного повреждения, базовая репарация, нуклеотидная репарация исправление несоответствия, негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация [145].

После повреждения ДНК, она может быть восстановлена через механизмы восстановления клеточной ДНК, накапливать новые мутации или запускают апоптоз клетки [6, р. 235]. Вполне вероятно, что помимо вышеуказанных путей восстановления ДНК, которые присутствуют в большинстве типов клеток, гаметы имеют специализированные механизмы восстановления окислительного повреждения. Например, есть предположение, что ооциты оснащены встроенными защитными механизмами, и, используют антиоксидантные ферменты, снижают глутатион и поддерживают молекулы антиоксидантов в окружающей их среде [146]. В 1998 г. Маторрас и др. пришли к выводу, что это соотношение полиненасыщенных жирных кислот на мембране ооцита может быть уникальным [147]. И, хотя, пока еще нет единого мнения о влиянии состава жирных кислот на исход оплодотворения ооцита, учитывая накопленные данные по изучению влияния окислительного стресса на сперматозоиды, можно было бы сделать предположение, что окислительно - поврежденные ооциты могут иметь низкие уровни полиненасыщенных жирных кислот, из-за чего возможно не происходит оплодотворение. Тем не менее, это только теория, и пока она требует дополнительных исследований в данном направлении.

Учитывая, что пыле-солевые аэрозоли Аральского моря являются смесью различных химических веществ, входящих в группу химических загрязнителей, интересным является результат их воздействия на репродуктивную систему женской особи. И хотя эффект воздействия отдельных тяжелых металлов, ксенобиотиков и других загрязнителей на развитие окислительного стресса и морфологических изменений ткани яичников частично изучен, все же остается открытым вопрос комплексного эффекта воздействия этих загрязнителей.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Общая характеристика экспериментального материала

Перед проведением экспериментального исследования был изучен процесс фолликулогенеза, основные этапы фолликулогенеза у человека и животных; особенности изменения овариального цикла у человека и животных в зависимости от внешних факторов. Для широкого изучения данного вопроса и в рамках написания главы литературный обзор, был проведен литературный поиск в электронных базах Scopus, PubMed, Web of Knowledge, Официальном сайте Всемирной Организации Здравоохранения и на официальном сайте Республиканского Центра Развития Здравоохранения Республики Казахстан, изучены диссертационные работы отечественных и зарубежных ученых.

Поиск проводился с использованием следующих ключевых слов: folliculogenesis, environmental factors and folliculogenesis, primary follicle, primordial follicles, heavy metal and folliculogenesis, rats ovarian histology, oxidative stress and ovarian reserve, environmental factors and chromosomal aberrations.

Из найденных источников выбирались полнотекстовые статьи на английском языке и русском языке включающие данные о человеке и экспериментах на животных.

В качестве объекта исследования использовались самки белых беспородных половозрелых крыс массой. Учитывая данные Pallav Sengupta 2013 г. о соотношении возраста крысы и человека, где говорится, что половозрелой лабораторные крысы становятся в возрасте от 6 недель и потомство приносят уже с 8-10 недель, мы решили изучать животных в возрасте 4-х месяцев [148]. Всего использовано 92 животных. Вес животных составлял 130-150 г.

Использование белых беспородных лабораторных крыс в нашем эксперименте обусловлено тем, что процессы фолликулогенеза у данного вида млекопитающих и у человека схожи, схоже так же строение половых желез; а также, учитывая специфику нашего эксперимента и желание изучить изменение фолликулогенеза в поколениях, этот вид животных быстро воспроизводится и достигает половой зрелости.

Животные содержались на стандартном рационе вивария при постоянной температуре и влажности воздуха в условиях естественной смены света и темноты. Учитывая циркадные механизмы регуляции биоритмов животных [96, p. 197], все опыты проводили в одинаковое время суток и сезоны. Все исследования с включением животных проводились согласно Приказу МЗ РК «Об утверждении правил доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан» от 25.07.2007г и Директиве 2010/63 Совета Европейского Союза по охране животных используемых в научных целях [149, 150]. Перед началом работы получено одобрение Этической комиссии по клиническим экспериментальным исследованиям КГМУ протокол № 267 от 31.10.2016 г.

Затравка проводилась проводилось в затравочной камере по методике Елевской Л.Т. в модификации Борисовой Л.Б. с соавторами в течении 30 дней по 4 часа 5 дней в неделю [151, 152].

Оценивали общее состояние животных в динамике. Ежедневно оценивалось состояние шерстяного покрова, двигательной и пищевой активности. Один раз в неделю проводили контроль изменения массы тела. Также, обращали внимание на клинические проявления со стороны слизистых и кожных покровов, учитывали количество летальных исходов, количество помета живорожденными и мертворожденными плодами.

В качестве химического загрязнителя выбраны пыле- солевые аэрозоли со дна Аральского моря. В ходе выполнения НТП «Комплексные подходы в управлении состоянием здоровья населения Приаралья», был проведен анализ химического состава аэрозоля методом атомно – абсорбционной спектрометрии. Данный анализ проведен научными сотрудниками центра ТОО Биоаналит на договорной основе. Состав солевой пыли Аральского моря указан в таблице 1: из расчета 1ppm=1мг/кг= 1г/т=0,0001%.

Таблица 1 – Состав солевой пыли Аральского моря

Химический состав	%	Химический состав	%
Sc	0,0004%	Nb	0,0008%
P <sub>43</sub>	eq <0,02%	Mo	0,0012%
Sb	<0,0015%	Sn	≤0,0001%
Mn	0,015%	V	0,0006%
Pb	0,0005%	Li	0,0025%
Ti	0,04%	Cd	<0,0005%
Zr	0,0025%	Cu	0,006%
As	<0,003%	Yb	0,00006%
Ga	0,0001%	Y	0,0006%
W	eq <0,0002%	Zn	≤0,002%
Cr	0,0008%	Ag	0,08
Ni	0,0003%	Co	0,0001%
Ge	<0,00005%	Sr	0,04%
Bi	<0,00005%	B	<0,002%
Ba	0,01%	Be	0,00006%
Примечание – Расчет 1ppm=1мг/кг= 1г/т=0,0001%			

Так образцы пыли были изучены на содержание химических веществ и дисперсию частиц пыли на базе лаборатории инженерного профиля «Физико-химические методы исследования» КарГУ им. Е.А. Букетова. Анализ проб на содержание химических веществ проводился методом атомной абсорбции на пламенном атомно- абсорбционном спектрофотометре Varian AA 140 (Австралия) и двухлучевом сканирующим спектрофотометре UV-1800 Shimadzu

(Япония). Дисперсия определялась на микроскопе Amplival (Carl ZEISS Jena). По результатам проведенного анализа, мы получили, что наибольшее количество частиц представлено размерами 0,2 и 0,1 мкм (Приложение Б).

Расчет навески приаральской соли вели по NaCl, так как содержание этой соли по предварительным тестам сделанным по количественному и качественному составу образцов пыли Аральского моря разными физико-химическими методами, является наибольшим по сравнению с другими солями. Расчет дозировки пыли – солевых аэрозолей Аральского моря проводился по нормативным документам «Приказ МЗ РК от 28 февраля 2015 года № 168 «Об утверждении Гигиенических нормативов к атмосферному воздуху в городских и сельских населенных пунктах», согласно которым величина среднесуточной ПДК хлорида натрия NaCl составляет 0,15 мг/м<sup>3</sup>. Токсическая доза составляет 10 ПДК что равняется 1,5 мг/м<sup>3</sup>. Объем ингаляционной камеры составляет 155л, согласно международной системе единиц СИ переводим это значение в м<sup>3</sup>: V[объем камеры]= 155л=0,155 м<sup>3</sup>. Таким образом в 1 м<sup>3</sup> воздуха должно содержаться 1,5 мг NaCl, а в 0,155 м<sup>3</sup>=0,155\*1,5/1=0,233 мг. Таким образом чтобы получить дозировку 1,5 мг/м<sup>3</sup> для камеры, находящейся в виварии КГМУ, необходимо использовать навеску содержащую 0,233 мг аэрозольной пыли Аральского моря.

Концентрация солевой пыли в затравочной камере на протяжении эксперимента контролировалась с помощью аналитического измерителя концентрации пыли «Прима 01» научным сотрудником лаборатории при КГМУ.

Учитывая поставленные задачи, животные случайным образом были разделены на следующие группы: контрольная группа – 20 крыс, из которых 10 особей по истечении 30 дней наблюдения были выведены из эксперимента. Для сравнения рождаемости опытной и контрольной группы остальные 10 особей были рассажены по клеткам с интактными половозрелыми самцами весом 180-220 грамм в соотношении 2:1; опытная группа 30 крыс, из которых 10 особей после 30 дней эксперимента выводились из него, к остальным 20 особям подсаживались интактные половозрелые самцы весом 180-220 грамм для получения потомства. После получения потомства от животных 2-й группы, животные делились по половому признаку и дальнейшее наблюдение проводилось только за особями женского пола. По достижению самками 4-х месяцев (животные 3-й группы n(12)) животные маркировались и в течении 30 дней также подвергались ингаляционной затравке пыли- соевыми аэрозолями Аральского моря в дозе 1,5 мг/м<sup>3</sup>. При этом за животными ежедневно, как и в первой части эксперимента проводилось наблюдение. Оценивался шестидневный покров, активность животных. Один раз в неделю производили взвешивание животных. После проведения ингаляционной затравки в течении 30 дней часть животных выводилась из эксперимента, другая часть рассаживалась с интактными половозрелыми самцами для получения потомства (4-я группа n-10). По достижению самками 4-й группы половозрелого возраста, животные выводились из эксперимента (рисунок 1).

Итого опытная группа составила 52 особи, контрольную группу составили 40 особей.

Все крысы были умерщвлены в цикле течки. Удаленные яичники и матку очищали от жировых тканей и промывали физиологическим раствором. Тканевая бумага использовалась для удаления излишков жидкости и взвешивалась с использованием цифровых весов с точностью до 0,001 г.

После ингаляционной затравки и забора материала для лабораторного и морфологического исследования все животные были утилизированы согласно Пункту 52 в редакции Постановления Правительства Республики Казахстан от 07.08.2012 №1030.

## **2.2 Изучение накопления химических веществ в тканях яичников**

В пыле- солевых аэрозолях Аральского моря содержатся различные вещества, в том числе и тяжелые металлы, которые запуская каскад патологических реакций могут по-разному влиять на организм человека [13, с. 61].

Для определения химического состава пыле – солевого аэрозоля был проведен атомно – абсорбционный анализ центром ТОО Биоаналит на договорной основе а рамках работы над НТП. Дополнительно перед проведением экспериментальной части работы было проведено исследование на наличие репродуктивно токсичных тяжелых металлов в этих аэрозолях (Приложение В). Определяли наличие репродуктивно токсичных тяжелых металлов, таких как свинец, кадмий, медь и цинк. Перечень определяемых металлов сформирован исходя из специфики антропогенной нагрузки. Токсические эффекты металлов обусловлены с следующими механизмами действия: формирование ковалентных связей с этими группами металлов, тормозящих или изменяющих активность ферментов или нарушающих целостность клеточных мембран [51, с. 5]. Для качественного и количественного определения металлов в биологических объектах использовали метод атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией [153, 154].

Спектрометрические методы анализа основаны на регистрации испускания или поглощения квантов электромагнитного излучения атомами или молекулами исследуемого вещества [48, с. 138; 60, р. 298; 62, р. 121; 64, с. 7; 66, р. 1064; 67, р. 17]. Для разложения биологических образцов и последующего хранения использовали азотную кислоту по причине простого фонового спектра. Добавляли 25 мл  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  [4:1] и нагревали до получения прозрачности. Образцы доводили до 10 мл 0,5% раствором  $\text{HNO}_3$  и проводили анализ. Анализ проб на содержание тяжелых металлов в биологических тканях проводился в лабораторных условиях методом атомной абсорбции на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре Varian AA 140 (Австрия) и двухлучевом сканирующем спектрофотометре UV-1800 Shimadzu (Япония).

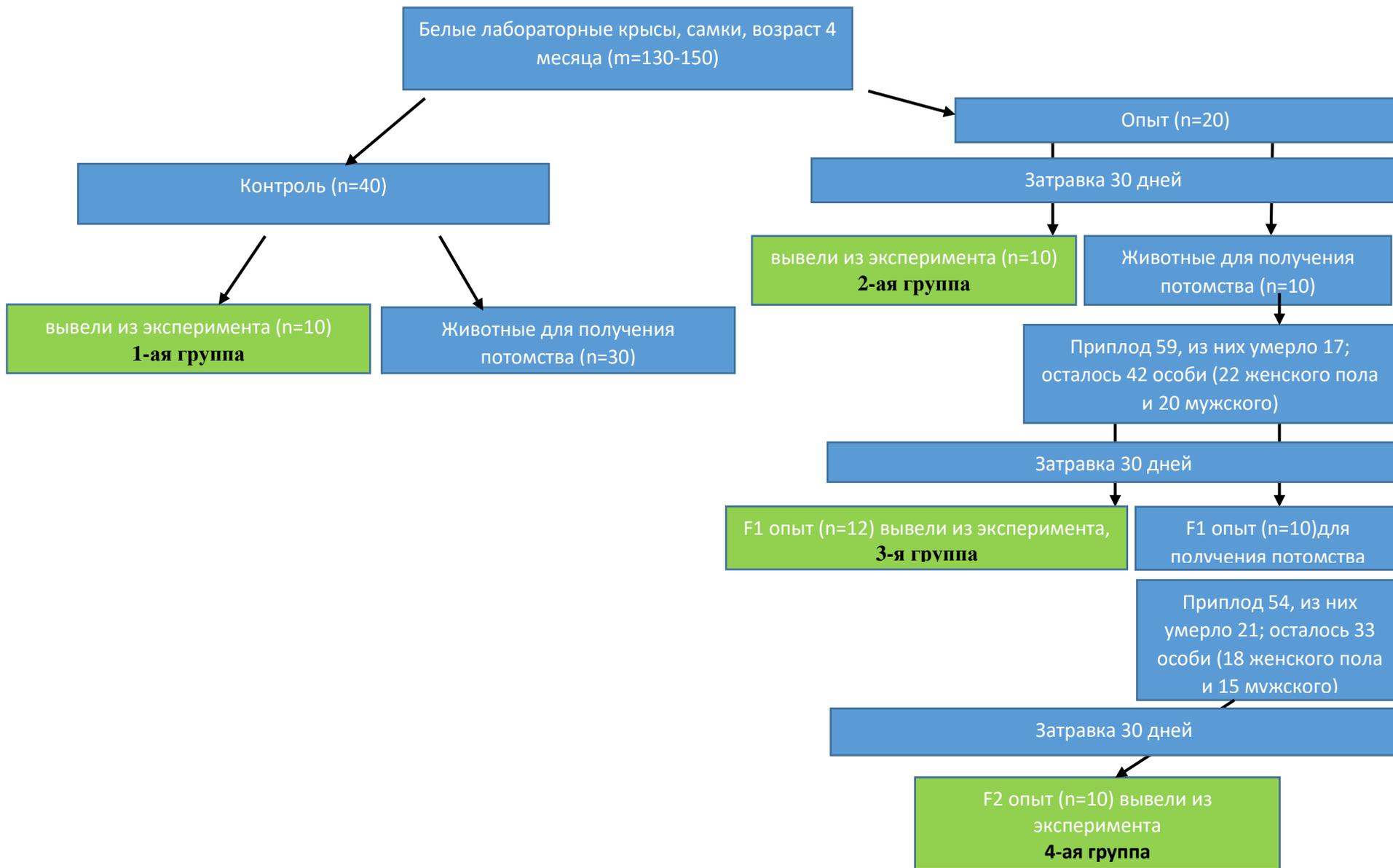


Рисунок 1 – Дизайн исследования

### **2.3 Морфологическая оценка состояния яичников самок белых крыс**

Для гистологического исследования материала ткань яичника фиксировали в нейтральном 10% формалине, затем по общепринятой методике проводили заливку в парафин, с последующим приготовлением гистологических препаратов. Для обзорного гистологического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные препараты были сфотографированы с помощью микроскопа Arcturus.

Для изучения морфометрических показателей ткани яичников в норме и патологии применяли следующие методы:

1) количественная и качественная фолликулометрия в яичниках у самок крыс группы сравнения и опытных групп 1-го, 2-го и 3-го поколения;

2) количественная и качественная оценка желтых тел в яичниках у самок крыс контрольной и опытных групп 1-го, 2-го и 3-го поколения.

Оценка всех стеклопрепаратов проводилась по методу двойного слепого исследования в эксперименте, когда стеклопрепараты были пронумерованы сквозной нумерацией без определяющих надписей, и оценивались двумя людьми независимо друг от друга. Средний результат фиксировался.

Фолликулометрию проводили, изучая следующие показатели:

– в примордиальном фолликуле оценивали наличие или отсутствие микроядер, дегенерации ядра; вакуолизации фолликулярной жидкости;

– в первичном фолликуле изучали наличие или отсутствие микроядер, дегенерации ядра; вакуолизации фолликулярной жидкости, целостность zona Pellucida;

– во вторичном фолликуле оценивали толщину внутренней теки, вакуолизацию фолликулярной жидкости, целостность zona Pellucida, разрывы между гранулезными клетками теки;

– в третичных фолликулах измеряли диаметр фолликула, толщину теки, наличие или отсутствие разрывов между клетками теки и слоистость теки, вакуолизацию фолликулярной жидкости;

– в атретических фолликулах проводилось измерение среднего диаметра.

Так же проводился количественный подсчет всех видов фолликулов в каждом конкретном яичнике.

Фолликулометрию проводили в репрезентативном гистологическом срезе яичника. Репрезентативный срез – это наибольший продольный срез яичника, представленный наибольшей площадью яичника. Наибольшая площадь сечения определялась серийными срезами одного блока и сравнением этих срезов между собой.

Гистологически оценивали диаметр третичного и атретического фолликула. Диаметр фолликула определялся следующим образом: проводилось 4-кратное измерение через центр в соответствии с условным циферблатом. Точками соединения были условно линии, соединяющие часы 12-18 часов, 9-15 часа, 14-20 часов и 10-17 часов. После всех измерений выводилось среднее число. За нормальный диаметр принимался средний диаметр фолликулов группы сравнения.

Оценка вакуолизация фолликулярной жидкости проводилась в процентах, где площадь вакуолизации <5% - принимали за 0; от 5 до 50 % - 1; >50 % - 2.

Целостность zona Pellucida оценивалась так же в процентах, где принимали значения:  $\geq 95\%$  - 0;  $< 94\%$ -50% - 1;  $< 50\%$  - 2. Zona pellucida это толстая внеклеточная оболочку, которая окружает все яйца млекопитающих и предимплантационные эмбрионы. Она необходима для поддержания связи между ооцитами и фолликулярными клетками во время оогенеза. Zona pellucida защищает яйцеклетки и эмбрионы во время развития и регулирует взаимодействие между овулированными яйцеклетками и свободно плавающими сперматозоидами во – время и после оплодотворения [155-157].

Наличие микро-ядер при просмотре фолликулов разной степени развития, может говорить нам о возможной передаче неполноценного генетического материала в случае достижения этим фолликулом степени зрелости и оплодотворения совулированной яйцеклетки сперматозоидом.

Микроядра и разрывы между гранулезными клетками оценивались по наличию, есть – 1, нет – 0.

Тека клетки-это группа клеток, окружающих фолликул, и которые играют несколько функций в процессе фолликулогенеза. В начале они участвуют в дифференцировке клеток из стромальных, далее являются основным источником синтеза андрогенов в яичнике, обеспечивают передачу сигналов между клетками гранулезы и ооцитом, путем создания сосудистой системы и передачи питательных веществ. Гранулезные клетки с самого начала развития фолликула имеют только один ряд и во время созревания разрастаются. Они несут так же, как и тека клетки ряд функций, одной из которых является эндокринная. В процессе фолликулогенеза под воздействием ФСГ в гранулезных клетках вырабатывается ароматаза, которая действуя на андрогены, синтезируемые в Тека клетках, превращает их в эстрадиол. Так же в гранулезных клетках вырабатываются факторы роста, которые по мере развития взаимодействуют с ооцитом. Тека клетки совместно с гранулезными клетками образуют желтое тело и вырабатывают прогестерон. С гипер- или гипоактивностью тека клеток связывают проблемы с фертильностью, так как при гиперактивности вырабатывается значительное количество андрогенов, которые не успевают переходить в эстрогены, а при гипоактивности происходит недостаток эстрогенов и тем самым тонкий эндометрий матки, недостаточный для качественной имплантации [158, 159].

При описании морфологической структуры яичников мы так же описывали строение желтых тел, их количество форму, размеры. Количество желтых тел просчитывалось в репрезентативном срезе.

Количественная и качественная оценка желтых тел проводилась оценкой размеров площади сечения желтых тел, вакуолизации цитоплазмы лютеоцитов, лютеолизиса, оценкой эндотелизацией.

Площадь желтых тел в гистологическом срезе проводили по математической формуле  $S = \pi R^2 = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2$ . Где S = это площадь в микрометрах, а D- это средний диаметр желтого тела. Средний диаметр определялся также

четырежды измерением через центр в соответствии с условным циферблатом часов, с последующим выведением среднего значения. Вакуолизация цитоплазмы оценивалась в процентах следующим образом: < 10% клеток - 0; 10-30% - 1; 31-50% - 2; 51-80% - 3; > 81% - 4. Лютеолизис вычисляли также в процентах, где принимали  $\leq 5\%$  разрушенных клеток - 0, 5-30% - 1; 30-60% - 2; > 60% разрушенных клеток - 3.

Также мы оценивали общую площадь яичника. Соотношение площади коркового вещества к мозговому веществу яичника.

Для изучения ультраструктурного состояния тканей яичников белых крыс после воздействия на них пыле-солевыми аэрозолями использовали трансмиссионную электронную микроскопию. Для трансмиссионной электронной микроскопии кусочки яичников фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере и дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия. Проводку материала выполняли по общепринятой методике с последующим заключением в эпон. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим-азуром II и основным фуксином, изучали светооптическим методом. Ультратонкие срезы (30-60 нм) получали ультрамикротомом Leica U70, после контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу просматривали и фотографировали на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 Carl Zeiss.

Результаты обработки данной методики исследования фолликулогенеза яичников самок крыс включены в «Методика проведения структурной оценки фолликулярного состояния яичников у экспериментальных животных», внедренной на кафедре морфологии и физиологии в учебный процесс (Приложение Е).

#### **2.4 Влияние химических загрязнителей, входящих в пыле-солевые аэрозоли Аральского моря, на наследственный материал самок крыс и их потомства**

Исследования геномной нестабильности проводили на клеточном и хромосомном уровнях. Для исследования использовали костный мозг животных, ввиду того что это постоянно делящаяся ткань и в нем много клеток, а также, костный мозг очень чувствителен к различного рода воздействиям окружающей среды. Мутагенное действие на клеточном уровне оценивали с помощью микроядерного теста, который основан на учете микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга J.A. Heddle и W. Schmid 1973 г. [160, 161].

Данный тест основан на подсчете клеток с микроядрами и такие нарушения структуры ядра, как протрузии различного вида, наличие апоптозных телец, кариолизиса и др., и является наиболее доступным, простым в исполнении и чувствительным методом изучения влияния экологических факторов. По данным некоторых авторов, поскольку селезенка удаляет эритроциты с поврежденными ядрами, количество микроядер в периферической крови может отличаться от такового в костном мозге. Следовательно, изучение последнего является наиболее достоверным [162]. Микроядра могут быть результатом

повреждения целой хромосомы или поломки ее части, поэтому тест имеет преимущество перед обычным тестом на хромосомную aberrацию в том, что могут быть обнаружены как анеугоенные, так и хромосомные агенты [163, 164]. Мы оценивали полихроматофильные эритроциты в мазках костного мозга, поэтому именно эти клетки являются последними в делении бластных клеток в ходе эритропоэза.

Так как в литературных данных имеется множество различных методических подходов к проведению микроядерного теста, мы решили указать способы фиксации и окраски стеклопрепаратов. В качестве фиксатора использовался 96% этиловый спирт, как наиболее доступный и не требующий дополнительного приготовления раствора. Фиксация проводилась в течении 15 минут, так как согласно данным диссертации Юркина А.Ю. на тему «Методические особенности анализа микроядер в клетках человека и животных при скрининге кластогенных факторов в окружающей среде» 2002 г., именно пятнадцатиминутная фиксация в этиловом спирте дает наибольшее количество обнаруженных эритроцитов с микроядрами. Для наиболее наглядной окраски нами выбран метод окраски по Паппенгейму, при которой свежие мазки высушиваются на воздухе, затем погружаются в раствор Майн-Грюнвальда на 3 минуты, далее без промывки погружаются на 15-20 минут в раствор Гимза.

Оценивали 1000 клеток на один стеклопрепарат костного мозга, в целом, изучали по 5000-6000 полихроматофильных эритроцитов от каждого животного. Полученные данные проверялись на нормальность распределения и проводились методы описательной статистики и межгруппового сравнения.

Мутагенное действие пыле- солевых аэрозолей Аральского моря на хромосомном уровне оценивали с помощью получения метафазных пластин из клеток костного мозга. Предварительно животному вводили подкожно колхицин из расчета 2,5 мг на кг массы тела животного, затем через 2 часа после введения проводилась эвтанзия животного методом декапитации. Далее быстро обнажалась бедренная кость животного и разогретым до 37<sup>0</sup>С 0,075М раствором КСL костный мозг вымывался из кости в пробирку, объем гипотонического раствора довели до 8 мл. Затем пробирки с гипотоническим раствором и костным мозгом помещались на 30 минут в термостат при температуре 37<sup>0</sup>С.

После термостата, раствор центрифугировался 1000 об. В течении 3-х минут и далее проводилась фиксация. Фиксатором выступал раствор этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1, объем фиксатора в первый раз достигал 5 мл, последующие разы 2мл. Время фиксации составляло 20 минут после каждой новой порции фиксатора. Всего проводилось 3 этапа фиксации. После последней фиксации взвесь центрифугировалась, надосадочная жидкость сливалась, и осадок вновь ресуспензировался небольшим количеством фиксатора. Далее взвесь раскапывалась на горизонтально расположенные стекла с высоты 20 см. Стекла предварительно обезжиривались спиртом, помещались в дистиллированную воду и охлаждались в холодильнике.

Перед нанесением материала на стеклах образовывали пленку из 5-6 капель 55% ледяной уксусной кислоты пастеровской пипеткой с последующим

распределением раствора по стеклу полирующими движениями для увеличения количества метафазных пластинок в одном поле зрения [165]. Материал раскапывали по 2 капли на стекло с разных его краев. После высыхания стеклопрепаратов при комнатной температуре они окрашивались забуференным раствором красителя Романовского - Гимза в течении 25 минут, высушивались, затем проводился анализ. Подсчет и оценка хромосомных aberrаций проводилась на 100 метафазных пластинах со свободным распределением хромосом, без наложений друг на друга.

Цитогенетический анализ осуществляли с помощью метафазного метода, определяли общую частоту и спектр хромосомных aberrаций. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Zeiss).

## **2.5 Оценка окислительного стресса у самок крыс и их потомства в крови и гомогенате яичников**

Исследование показателей окислительного стресса и антиоксидантной защиты проводилось на базе лаборатории кафедры биологии Карагандинского государственного медицинского университета. Разделить методики по крови и гомогенату.

Оценку окислительного метаболизма и антиоксидантной защиты проводили, исследуя кровь экспериментальных животных, а также гомогенат яичников.

Для оценки состояния окислительного метаболизма в гомогенате яичников у экспериментальных животных проводили оценку накопления малонового диальдегида (МДА) как наиболее активного и устойчивого продукта перекисного окисления. Оценка проводилась по модифицированному методу Э.Н. Коробейниковой [166]. Для оценки антиоксидантной защиты определяли активность глутатионпероксидазы (ГПО) в гомогенате яичников по методу Власова С.Н и др. [167] и активность каталазы (КАТ) по методу М.А. Королюк с соавторами [168]. Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Для приготовления гомогената ткань яичника замораживали в жидком азоте, затем измельчали.

К 5 мл гомогената яичника добавляли 5 мл 20% фосфорно-вольфрамовой кислоты, после чего смесь охлаждали и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, а к осадку приливали 2 мл дистиллированной воды. Далее приливали 1 мл тиобарбитуровой кислоты, вновь перемешивали. Смесь ставили в водяную баню. По истечении 1 часа смесь охлаждали в холодной воде и снова центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Определение малонового альдегида проводили на спектрофотометре относительно дистиллированной воды при длинах волн 535 нм и 580 нм.

Определение активности глутатионпероксидазы (ГПО) гомогенате яичника проводили по методу Власова С.Н и др. [167, с. 21]. Для этого в центрифужные

пробирки набирали 0,2 мл гомогената, 1 мл фосфатного буфера, 0,5 мл глутатиона восстановленного и 0,5 мл перекиси водорода. Далее через 1 мин добавляли 1мл 10%-ного раствора тетрахлоруксусной кислоты. Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Определение глутатионпероксидазы проводили на спектрофотометре при длине волны 260 нм относительно воды.

Определение активности каталазы (КАТ) проводили по методу М.А. Королук с соавт. [168, с. 17]. Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Сначала готовили раствор перекиси водорода. Затем к 20 мл  $H_2O$  добавляют 0,02 мл гомогената. Полученную смесь инкубировали в течении 10 мин, после чего в каждую пробирку добавили по 1 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм. Оптическую плотность измеряют при  $\lambda$  410 нм против контроля.

Активность КАТ в гомогенате яичника выражали в нмоль  $H_2O_2$  /мл/мин. При расчете использовали коэффициент молярной экстинкции  $22,2 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$

## **2.6 Статистические методы исследования**

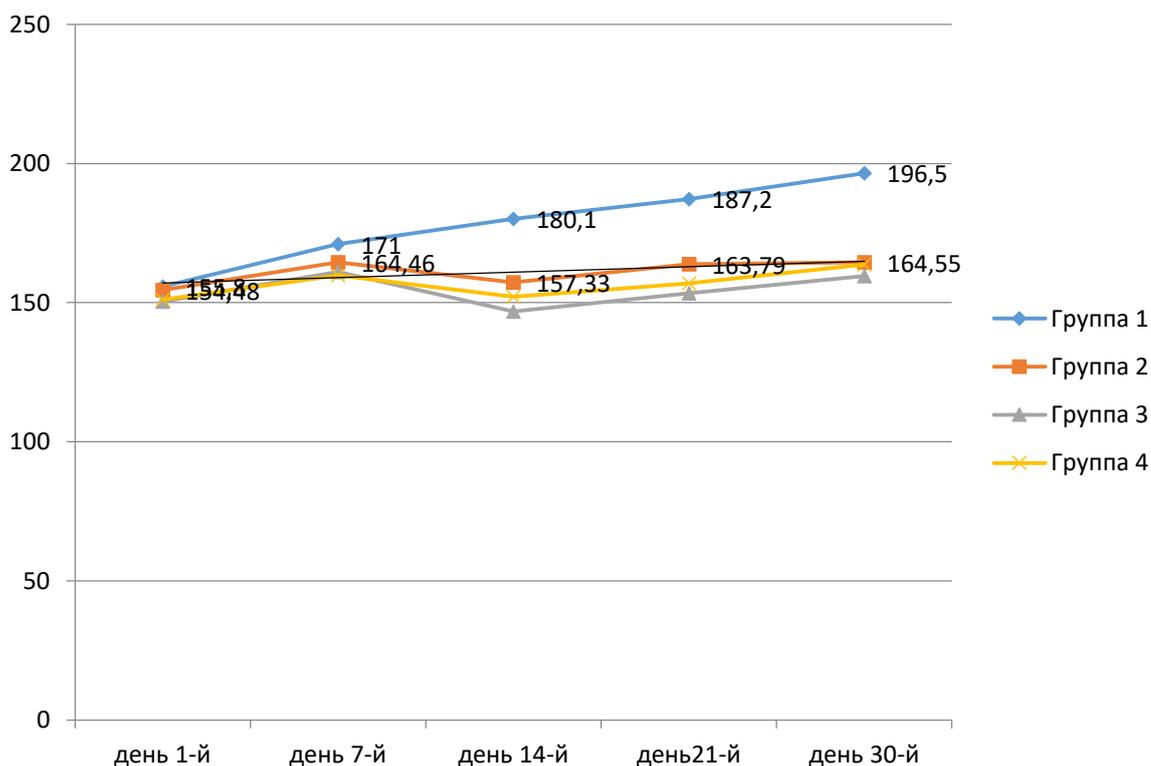
Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием соответствующих статистических тестов и программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft). Значения параметров были представлены как средние арифметические и стандартные отклонения, медианы, минимальные и максимальные значения, диапазон изменчивости. Все параметры предварительно были изучены на нормальность распределения данных. В качестве компонента сравнения между 2 группами использовался U-критерий Манна-Уитни. Для анализа различий между 2 и более группами использовался H-критерий Краскела-Уоллиса и множественные сравнения средних рангов. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Накопление тяжелых металлов в ткани яичника

При изучении того или иного экологического фактора изучают способность его составных веществ или целого комплекса вызывать окислительный стресс в организме или гистологические и функциональные изменения определенных органов, наиболее подверженных воздействию. Репродуктивной токсичности изучаемых веществ отводится отдельная значительная роль. При изучении репродуктивной функции под воздействием определенных веществ оценивают количество приплода, количество до и постимплантационных потерь, а также роста - весовые показатели молодняка животных, подвергнутых воздействию.

По результатам наших наблюдений, которые проводились на протяжении всего эксперимента, у исходных животных из экспериментальной группы на 14-й день ингаляционной затравки реализовались внешние признаки стресса. Животные начинали вести себя беспокойно, агрессивно, у части особей наблюдалось выпадение шерсти. Влияние стресса проявилось снижением массы тела животных (рисунок 2).



1 – группа контрольные животные 2 – группа-затравленные животные; 3 – группа- затравленные животные(F1); 4 – группа- затравленные животные(F2)

Рисунок 2 – Динамика массы тела животных разных групп в период ингаляционной затравки по сравнению с контрольной группой

Масса тела вначале эксперимента возрастала, затем, начиная с 7-10 дня пошла на снижение, почти достигая начальных значений на 14 день эксперимента ( $152,08 \pm 5,27$ ). На 21-й день наблюдения отмечается незначительный прирост массы тела, по сравнению с предыдущим измерением (1 группа прирост составил 7,1 г, далее 6,46 г, 6,57 г и 4,8 г соответственно для 2, 3 и 4-й групп). Однако, масса тела опытных животных до конца эксперимента так и не превысила значений их массы тела на 7 й день наблюдений. При этом, вес этих животных отстает также и от значений контрольной группы и такое отставание массы тела наблюдается на протяжении всего эксперимента.

При оценке рождаемости крысят у экспериментальных групп, мы оценили общее количество родившихся крысят и количество умерших крысят в первые 7 суток. Для этого экспериментальных животных разделили на группы: первую группу составили контрольные животные, во вторую группу вошли опытные животные, в третью группу вошли крысята 1-го поколения от 2-й группы (рисунок 3).

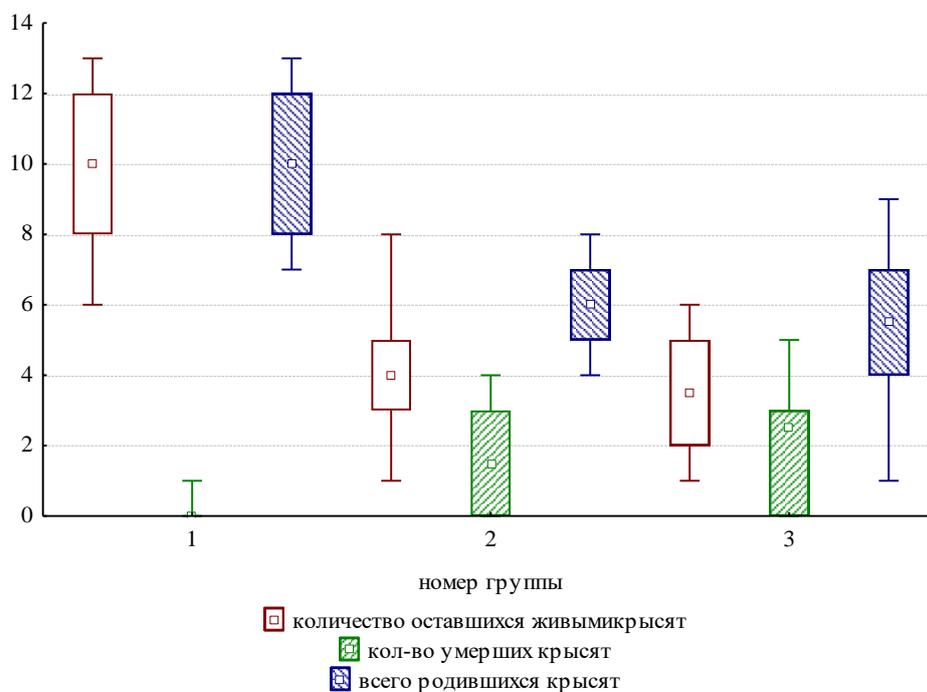


Рисунок 3 – Рождаемость в 1-й, 2-й и 3-й группах

Из анализа статистической обработки данных, мы выяснили, что 1 группа статистически значимо отличается по количеству родившихся крысят от 2 ( $p=0,004$ ) и 3 ( $p=0,002$ ) групп. 2 и 3 группы по данному показателю между собой статистически значимо не отличаются. При проведении ингаляционной затравки мы проводили анализ выживаемости экспериментальных животных после рождения в течение 7 суток, нами зафиксирован падеж крысят 2-й и 3-й исследуемых групп. 1 группа статистически значимо отличаются по количеству оставшихся живыми крысят от 2 ( $p=0,003$ ) и 3 ( $p=0,000$ ) групп. При этом 2 и 3

группа статистически значимо не отличаются друг от друга по данному показателю.

При оценке рождаемости и смертности крысят в раннем неонатальном периоде, у нас получились следующие значения: среднее количество родившихся крысят в 1-й группе на 40% выше чем во 2-й группе и на 50% выше чем в 3-й группе, также отмечается более высокая смертность молодняка в первые 7 суток у групп, подвергнутых ингаляционной заправке пыле- солевыми аэрозолями, а именно, во второй группе более чем в 2 раза, а в третьей группе более чем в 3 раза больше количество умерших крысят.

Таким образом, на наш взгляд пыле- солевые аэрозоли Аральского моря негативно влияют на репродуктивный статус экспериментальных животных и нарушается созревание яйцеклеток в процессе фолликулогенеза. Ооцит зависит от полноценного питания, от правильных регуляторных сигналов, которые проходят в клетках, окружающих фолликул. Местные материнские РНК регулируют начальные стадии развития и дифференциации молодого эмбриона [169]. В связи с этим, мы считаем, количество животных, родившихся в опытных группах ниже по сравнению с контрольной группы. Учитывая, что поражения плаценты, связанные с недостаточным кровоснабжением сосудов матери, являются одной из основных причин гибели плода, или рождением плода с низкой оценкой по шкале Апгар, мы предполагаем, что возможно во время беременности реализуется стрессовая реакция организма, нарушается маточно-плацентарный кровоток и крысята внутриутробно получают недостаточно питательных веществ и погибают в первые сутки жизни [170].

Следующим этапом эксперимента было исследование накопления химических веществ в тканях репродуктивных органов после ингаляционного воздействия пыле- солевыми аэрозолями Аральского моря в течение 30 суток.

Для оценки влияния химических факторов на ткани яичников и на репродуктивную систему, мы решили выяснить накапливаются ли в тканях яичников экспериментальных животных тяжелые металлы, содержащиеся в пыле – солевых аэрозолях Аральского моря. В литературе описаны случаи накопления тяжелых металлов в костях, в плацентарной ткани, в волосах, в крови и даже в ткани семенников в ходе экспериментальных работ и некоторых клинических исследованиях [171-173].

Однако, изучение накопления пыле – солевых аэрозолей Аральского моря в тканях яичника проводится впервые. Химический состав пыле- солевых аэрозолей со дна высохшего Аральского моря нами проводился в ходе работы над НТП «Комплексные подходы в управлении состоянием здоровья населения Приаралья», что указано в главе «Материалы и методы».

Наши исследования по химическому составу пыле- солевых аэрозолей Аральского моря подтверждают результаты исследований других авторов, проведенных ранее [152, с. 981; 155, р. 231].

Однако перед проведением экспериментальной работы, мы дополнительно провели анализ состава пыли на наличие репродуктивно-токсичных тяжелых металлов. А затем, по окончании ингаляционной заправки в течении 30 дней,

методом атомно-абсорбционной спектрометрии изучали возможность накопления тканями яичников тяжелых металлов, которые могут негативно сказываться на репродуктивной функции животных (Приложение Г).

Наш эксперимент показал, что ингаляционная затравка пыле – солевыми аэрозолями приводит к повышению содержания свинца в тканях яичника в опытной группе в 2,8 раза больше, чем в контрольной группе. В образцах опытной группы нами выявлено количественное содержание цинка в 2,7 раза больше, чем таковые в контрольной группе, а количественное содержание кадмия в 3,5 раза больше, чем таковое в контрольной группе. Результаты определения накопления частиц тяжелых металлов в тканях яичника представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание в пробах Cu, Zn, Pb, Cd (мг\кг)

	1 группа (n=10)			2 группа (n=10)		
	Mean	Confidence - 95,000%	Confidence + 95,000	Mean	Confidence - 95,000%	Confidence + 95,000
Cu	2,8	0,087	0,231	3,58	0,071	0,188
Zn	15,13	0,354	0,939	40,1	1,033	2,741
Pb	0,05	0,003	0,009	0,14	0,009	0,025
Cd	0,016	0,003	0,009	0,07	0,006	0,015
Примечание: p <0,00015						

В результате нашего исследования мы получили значение в тканях яичников крыс меди 3,6мг/кг в группе затравке, в контрольной группе 2,9 мг/кг. Содержание кадмия в среднем в группе затравке составило 0,07 мг/кг тогда как в контрольной группе этот показатель был 0,02мг/кг. Свинец в группе затравки содержался в дозе 0,12 мг/кг, а в контрольной группе этот показатель составил 0,005мг/кг. Самой значительной разницей стали показания цинка, средние значения которого в группе затравки достигли 40,58 мг/кг, тогда как в контрольной группе 15,1 мг/кг. Анализируя результаты проведенной нами работы, видно, что тяжелые металлы могут накапливаться в тканях репродуктивных органов не только при пероральном введении растворов их солей, но и при ингаляционной воздействию [174]. Из литературных данных известно, что эти тяжелые металлы способны снижать возможность к зачатию и вынашиванию беременности. Таким образом, мы можем предположить, что длительное вдыхание пыле- солевых аэрозолей Аральского моря может пагубно отразиться на репродуктивном потенциале населения проживающего в данном регионе, о чем свидетельствует полученные данные во время проведения нами клинического исследования в рамках НТП [4], и что подтверждается результатами экспериментального исследования о рождаемости животных в опытных группах.

На основании выше сказанного одно из направлений экспериментального исследования было посвящено изучению морфометрических показателей фолликулогенеза при ингаляционной заправке пыле- солевыми аэрозолями Аральского моря.

### **3.2 Морфологическая характеристика ткани яичников самок белых крыс и их потомства под воздействием пыле – солевых аэрозолей Аральского моря**

Макроскопически яичники животных 1-й группы представляли собой два уплотненных тела эллипсоидной формы, у которых отмечались притупленный латеральный и более острый медиальный конец. Передняя и задняя поверхности яичников характеризовались заметной выпуклостью. Органы были плотноватой консистенции на ощупь и на разрезе имели серо-белесый цвет.

При гистологическом исследовании на светооптическом уровне снаружи яичник был покрыт оболочкой, состоящей из низкокубического и местами уплощенного эпителия, расположенного на базальной мембране, и плотной волокнистой соединительной ткани. Под базальной мембраной, по периферии органа, определялось корковое вещество яичников. Основу коркового вещества составляла соединительная ткань с преобладанием коллагеновых волокон. Ближе к базальной мембране определялся участок коры, который преимущественно был образован тесно расположенными друг к другу волокнистыми структурами. Между ними были расположены относительно небольшое количество клеток соединительной ткани.

Макроскопически яичники всех опытных групп схожи с органами 1-й группы. Органы были плотными на ощупь и на разрезе имели серо-белесый цвет. Снаружи яичник покрыт оболочкой, которая выглядела уплотненной и состояла из уплощенного, местами низкокубического, эпителия и плотной волокнистой соединительной ткани. Базальная мембрана была более уплотнена, но иногда встречались участки разрыхления как базальной мембраны, так и самих мезотелиоцитов.

По периферии органа различалось корковое вещество яичника, основу которого составляла соединительная ткань. Наружный участок коры был образован тесно расположенными волокнистыми структурами. Между ними находилось относительно небольшое количество веретенных клеток. Во внутреннем участке коры определялись фолликулы на различных стадиях развития. Среди них были хорошо различимыми как примордиальные, так и растущие фолликулы

При изучении морфометрических показателей яичника в первую очередь мы обращали внимание на макроскопические показатели: средний диаметр яичника, размер яичника, размеры коркового и мозгового вещества.

В таблицах 3, 4, 5, 6 представлены средние размеры яичников у крыс, по группам.

Таблица 3 – Макроскопические размеры яичников животных 1-й группы

Группа 1	Кол-во животных	Mean	Confidence - 95,000%	Confidence - 95,000
ср.д яичника	10	3073	2853	3293
ср.д.мозг.в-ва	10	677	505	849
площадь яичника	10	7479408	6382376	8576440
площадь корк.в-ва	10	7079063	6161401	7996726
площадь мозг.в-ва	10	400344	181602	619087

Из данной таблицы видно, что средний диаметр яичника в контрольной группе достигал 3073 мкн., площадь яичника 7479408 мкн. Соотношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества в этой группе равняется 17,68 /1. Это один из важных показателей, так как именно корковое вещество содержит в своем составе фолликулы, которые и дают начало половым клеткам.

Таблица 4 – Макроскопические размеры яичников животных 2-й группы

2 группа	Кол-во животных	Mean	Confidence - 95,000%	Confidence - 95,000
ср.д яичника	10	2317	2051	2584
ср.д.мозг.в-ва	10	891	724	1059
площадь яичника	10	4314832	3365376	5264287
площадь корк. в-ва	10	3651774	2887503	4416045
площадь мозг в-ва	10	662457	407781	917134

Средний диаметр яичника во второй группе значительно меньше такового в контрольной группе, и равняется 2317 мкн., соотношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества равняется 5,5/1. Таким образом, обращает на себя внимание значительная разница соотношений этих показателей между 1-ой и 2-ой группами. Площадь яичника в данной группе в 1,73 раза меньше чем площадь яичника в контрольной группе.

Таблица 5 – Макроскопические размеры яичников животных 3-й группы

3 группа	Кол-во животных	Mean	Confidence - 95,000%	Confidence - 95,000
Ср.д.яичника	12	2268	1987	2549
Ср.д.мозг.в-ва	12	790	707	873
Площадь яичника	12	4179163	3094043	5264282
Площадь корк.в-ва	12	3677310	2639971	4714649
Площадь мозг в-ва	12	501853	406161	597544

Средний диаметр яичника в 3-й группе 2268 мкн. Это значение близко со средним диаметром яичника во второй группе. Однако, средний диаметр яичника 3-й группы в 1,35 раза меньше, чем таковое значение в 1-й группе. Соотношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества равно 7,3/1.

Таблица 6 – Макроскопические размеры яичников животных 4-й группы

4 группа	Кол-во животных	Mean	Confidence - 95,000%	Confidence - 95,000
Ср.д.яичника	10	2048	1837	2259
Ср.д.мозг.в-ва	10	698	611	786
Площадь яичника	10	3353633	2633686	4073580
Площадь корк в-ва	10	2960439	2235541	3685338
Площадь мозг в-ва	10	393194	294945	491442

Из таблицы 6 видно, что средний диаметр яичника в 4-й группе практически такой же, как и в 3-й и во 2-й группах; соотношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества = 7,5/1. На рисунках 4, 5, 6 и 7 представлены значения средних яичников в группах.

Изменение размеров яичников в поколении при ингаляционной заправке пыле- солевыми аэрозолями не происходит, однако стоит заметить, что в структуру яичника входит корковое и мозговое вещество. Именно в корковом веществе яичника происходит многоступенчатое развитие фолликула до появления зрелой яйцеклетки. На рисунке 8 наглядно видно, что происходит снижение соотношения площади коркового вещества к площади мозгового вещества, в первой группе оно равно 17,68, во второй 5,5, в третьей группе 7,5, в четвертой 7,3 (рисунок 8). Происходит уменьшение площади именно функциональной части яичника, что в дальнейшем сказывается на

морфологических показателей фолликулогенеза и овариальном резерве женских особей в поколениях.

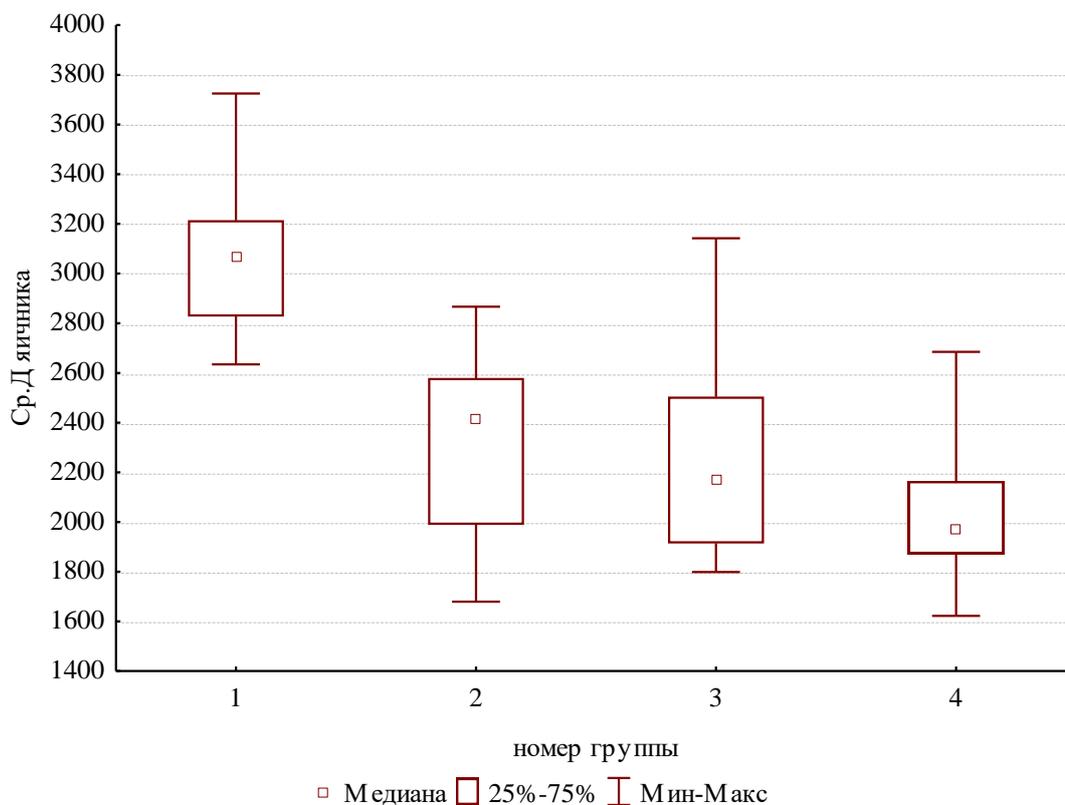


Рисунок 4 – Средний диаметр яичника в исследуемых группах

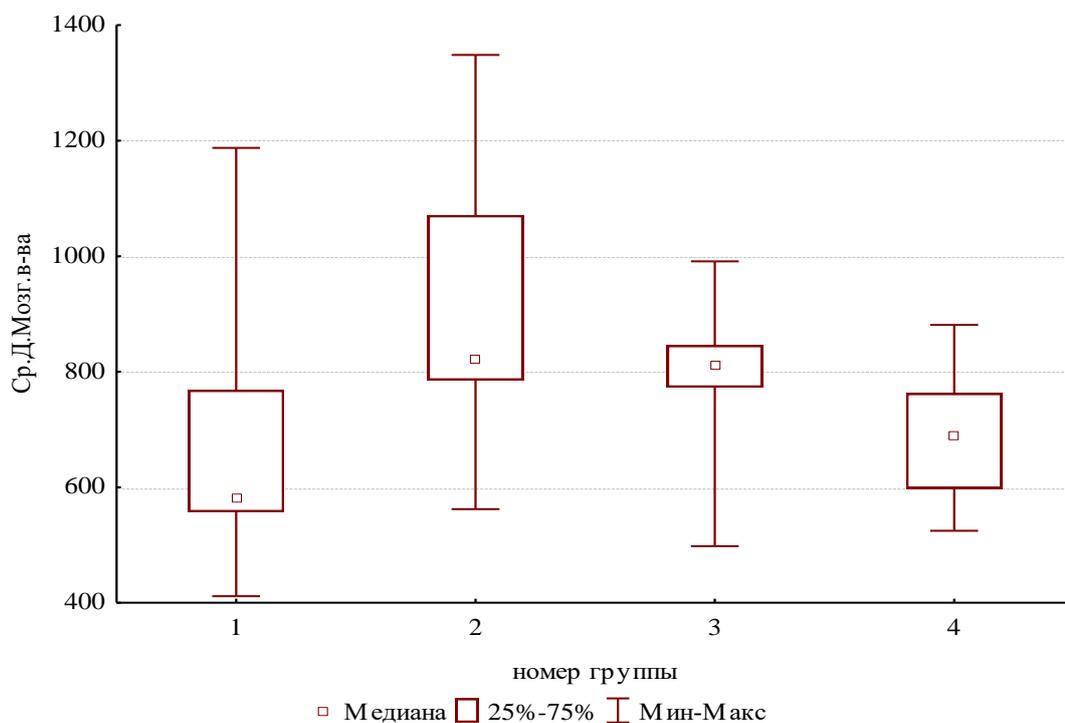


Рисунок 5 – Средний диаметр мозгового вещества в исследуемых группах

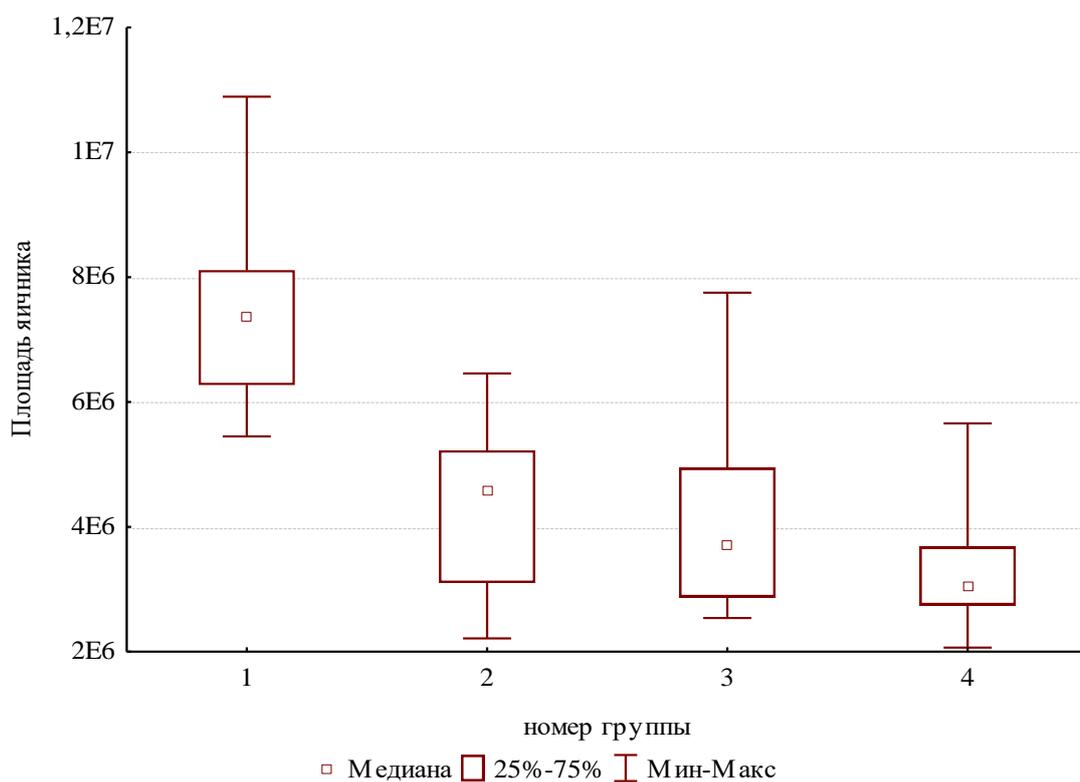


Рисунок 6 – Площадь яичника в исследуемых группах

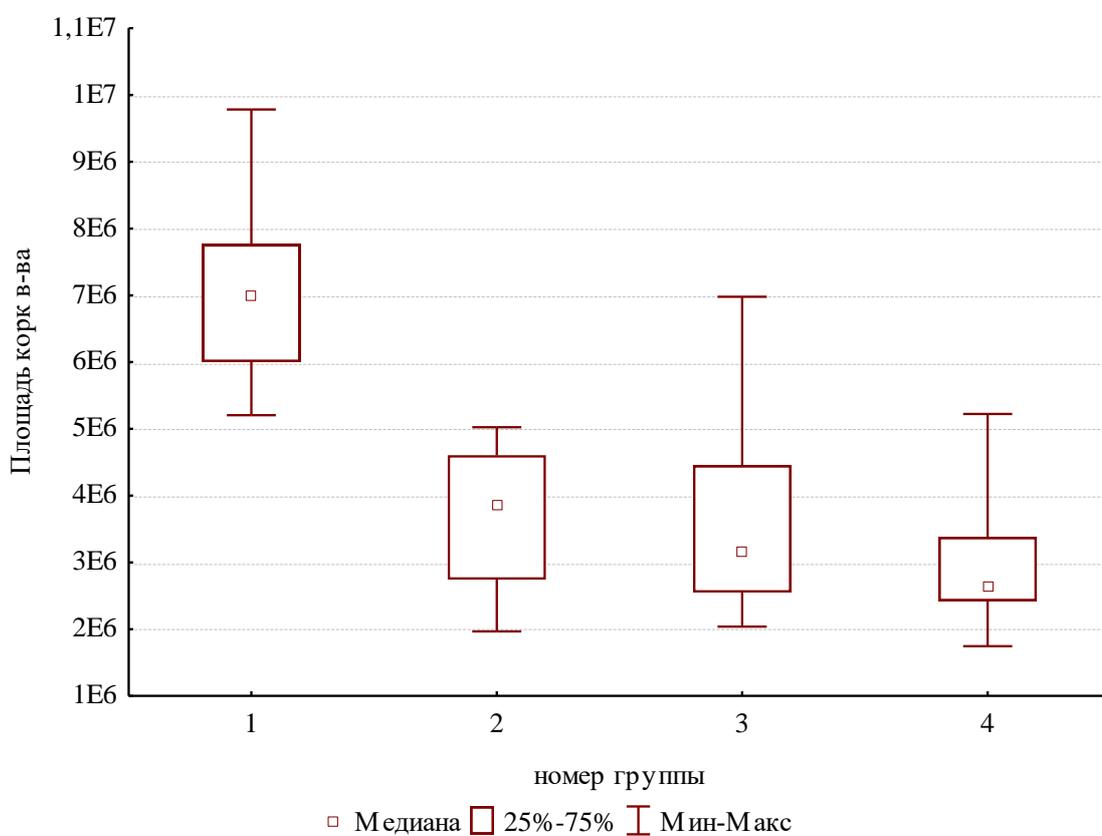


Рисунок 7 – Площадь коркового вещества в исследуемых группах

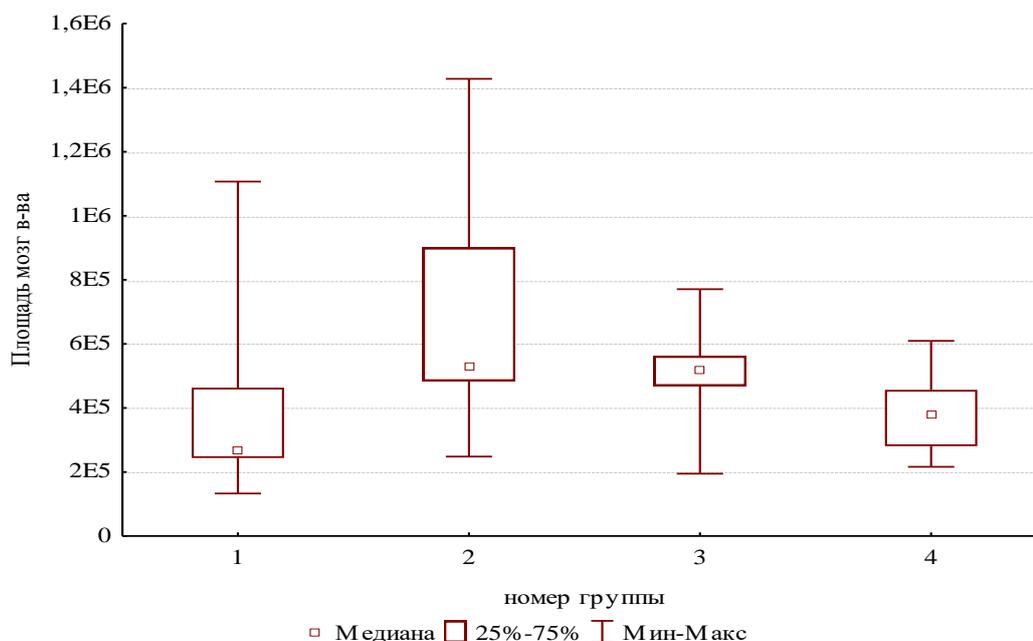


Рисунок 8 – Площадь мозгового вещества в исследуемых группах

При сравнении размеров яичников у животных 1-ой и 2-ой групп выявлены статистически значимые различия по всем показателям (таблица 7).

Таблица 7 – Сравнение размеров яичника у животных 1 и 2 исследуемых групп

Показатель	U	p-level	Valid N - Group 1	Valid N - Group 2
Ср.д. яичника	4,000	0,001	10	10
Ср.д.мозг.в-ва	22,00	0,034	10	10
Площадь яичника	4,000	0,001	10	10
Площадь корк. в-ва	0,000	0,000	10	10
Площадь мозг. в-ва	22,00	0,034	10	10

Примечание – Mann-Whitney U Test,  $\alpha=0,05$

При статистическом сравнении размеров яичников между 2-й, 3-й, и 4-й группами статистически значимых различий не выявлено ни по одному размеру (таблицы 8-11).

Таблица 8 – Сравнение среднего диаметра яичника в 2, 3 и 4 группах

Группы	2 - R:19,90	3 - R:17,00	4 - R:12,50
2			1,000
3		1,000	
4		0,233	0,788

Примечание – Kruskal-Wallis test:  $H(2, N=32) = 3,166$   $p = 0,205$

Таблица 9 – Сравнение среднего диаметра мозгового вещества в 2, 3 и 4 группах

Группы	2 - R:20,30	3 - R:17,75	4 - R:11,20
2		1,000	0,090
3	1,000		0,309
4	0,090	0,309	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(2, N=32) = 5,046$ $p = 0,080$			

Таблица 10 – Сравнение площади яичника в 2, 3 и 4 группах

Группы	2 - R:19,90	3 - R:17,00	4 - R:12,50
2		1,000	0,233
3	1,000		0,788
4	0,233	0,788	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(2, N=32) = 3,166$ $p = 0,205$			

Таблица 11 – Сравнение площади коркового вещества в 2,3 и 4 группах

Группы	2 - R:18,90	3 - R:17,42	4 - R:13,00
2		1,000	0,479
3	1,000		0,815
4	0,479	0,815	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(2, N=32) = 2,161$ $p = 0,339$			

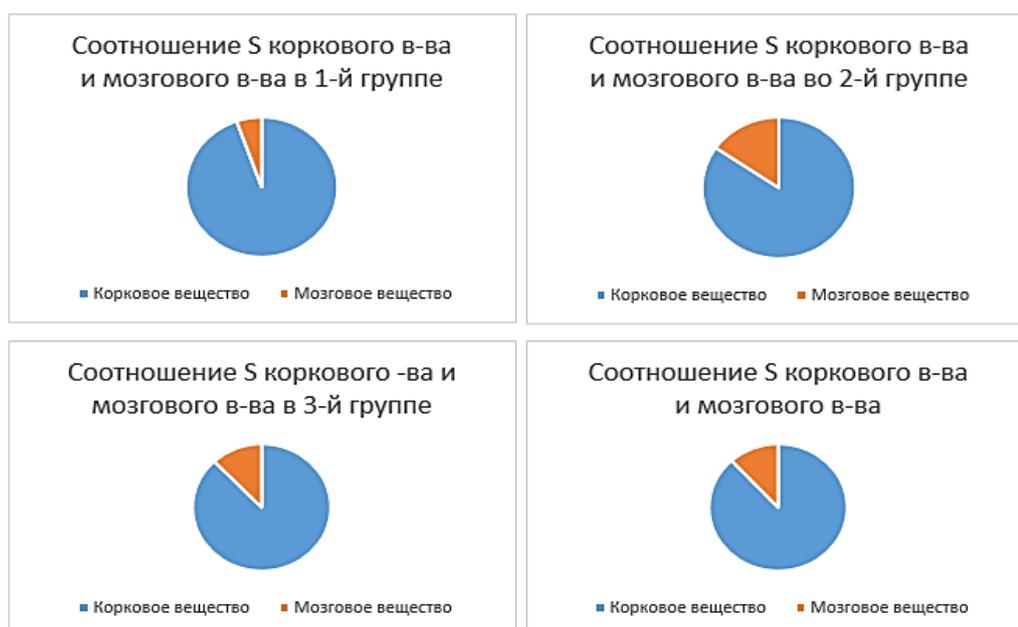


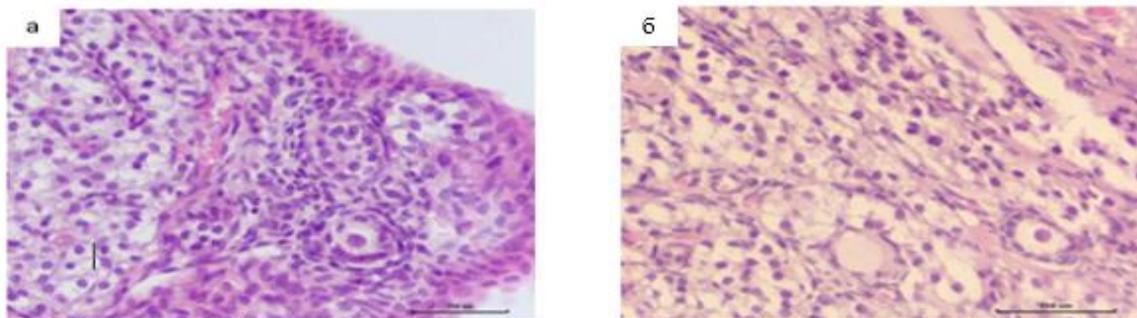
Рисунок 9 – Соотношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества

В корковом веществе яичника были видны фолликулы на различных стадиях развития. Морфология фолликулов в составе коркового вещества было весьма переменчивым. Среди них можно было различить как примордиальные, так и растущие фолликулы. В таблице 12 представлены данные по количеству всех видов фолликулов в каждой группе.

Таблица 12 – Количественные данные фолликулов по отдельным группам

Показатели	Valid N				Median				Minimum				Maximum				Lower - Quartile				Upper - Quartile			
	1 гр	2 гр	3 гр	4 гр	1 гр	2 гр	3 гр	4 гр	1 гр	2 гр	3 гр	4 гр	1 гр	2 гр	3 гр	4 гр	1 гр	2 гр	3 гр	4 гр	1 гр	2 гр	3 гр	4 гр
кол-во первичных фол-ов	10	10	12	10	8	5	3	3	6	4	1	2	10	9	5	5	6	4	2	3	9	6	4	3
кол-во вторичных фолл-ов	9	10	12	10	5	3	3	3	4	1	2	2	9	7	4	4	5	3	2	2	6	4	3	3
кол-о третичных фол-ов	9	9	10	9	3	2	2	2	2	1	1	1	8	6	3	2	3	1	1	1	5	3	2	2
кол-во атретичных фол-в	9	10	12	10	2	9	8	9	1	6	5	6	5	16	13	12	2	8	7	7	3	12	9	11
кол-во примордиальных фол-в	8	10	11	10	11	11	8	8	6	8	5	6	14	14	11	9	10	9	6	7	13	12	9	9

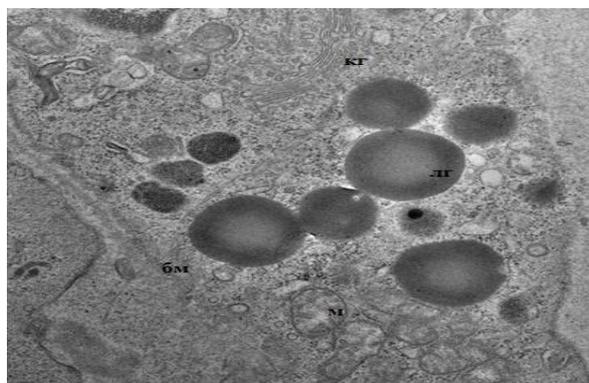
Количество примордиальных фолликул было значительно больше в непосредственной близости к белочной оболочке яичника, чаще они были представлены в виде тесно расположенных групп, хотя встречались и фолликулы, расположенные одиночно. Представлены были фолликулы в виде округлых структур, чаще шарообразной формы, окруженных одним слоем плоских клеток фолликулярного эпителия (рисунок 10). В группах 2, 3 и 4 количество примордиальных фолликулов было меньше чем в 1 группе. Они чаще были представлены как одиночные, реже встречались небольшие группы из нескольких фолликулов.



а) – первая группа; б) – вторая группа

Рисунок 10 – Примордиальные фолликулы в яичниках самок крыс. Окраска гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

При электронномикроскопическом исследовании яичников экспериментальных животных в 1-й группе было определено, что уплощенный фолликулярный эпителий примордиального фолликула содержал удлиненной формы ядро с примаргинально расположенным гетерохроматином и местами расширенным перинуклеарным пространством (рисунок 11).



М – митохондрии; КГ – комплекс Гольджи; ЛГ – липидные гранулы; БМ – базальная мембрана

Рисунок 11 – Контроль. Цитоплазме уплощенного первичного фолликула  
Электроннограмма ув. \*4000

Во 2-й группе исследования эпителий примордиальных фолликулов был резко уплотнен и растянут. В цитоплазме эпителия накапливались вторичные лизосомы, формирующиеся на месте дегенеративно измененных органелл (рисунок 12).

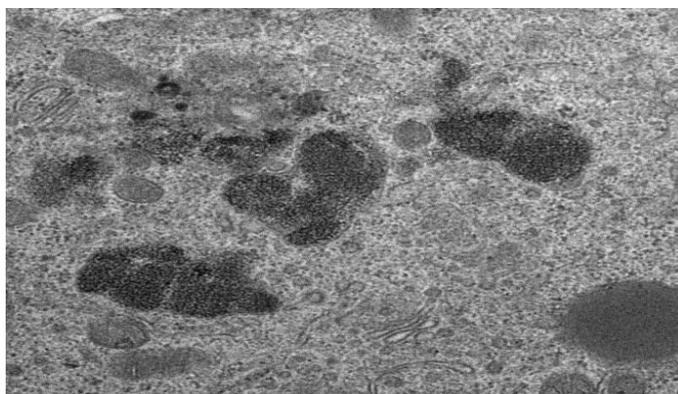
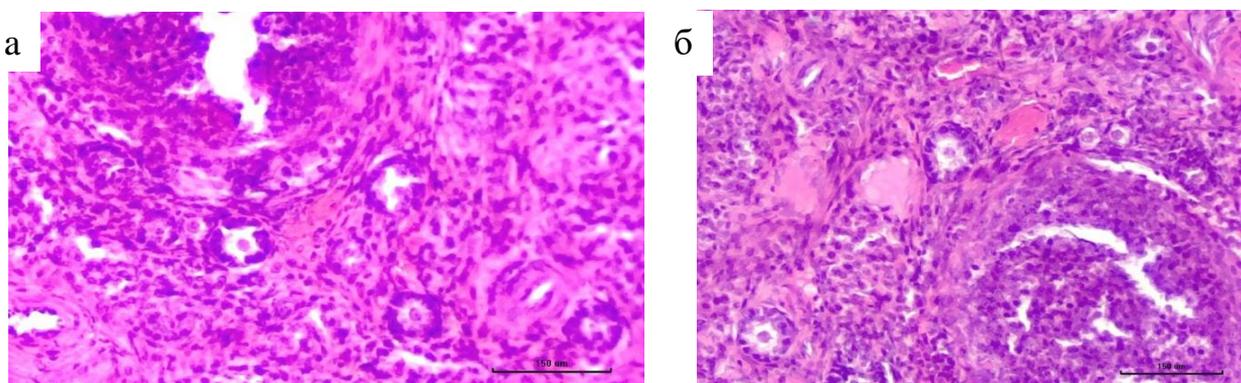


Рисунок 12 – Опыт. Цитоплазма первичного (примордиального) фолликула с лизосомами (ЛЗ) и дегенеративно измененными органеллами.  
Электроннограмма ув. \*8000

При световом микроскопировании среди растущих фолликул различались первичные, вторичные и третичные фолликулы.

Первичные фолликулы определялись сравнительно более крупными по размеру, состоящими из растущего ооцита, формирующейся блестящей зоны и одного слоя кубического фолликулярного эпителия (рисунок 13)



а – контрольная группа; б – опытная группа

Рисунок 13 – Первичные и примордиальные фолликулы в яичниках самок крыс.  
Окраска гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

Блестящая зона определялась в виде блестящего гомогенного слоя светло-розового цвета.

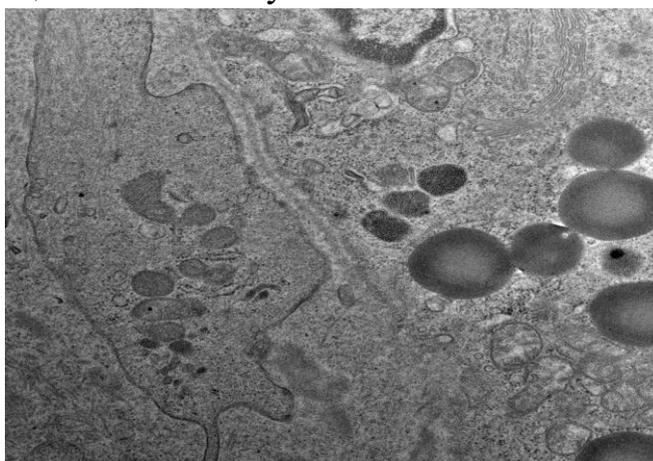
Первичные фолликулы в яичниках 2-й, 3-й и 4-й групп более крупные по размеру, чем примордиальные, но визуально были меньше чем соответствующие

фолликулы в контрольной группе, и состояли из растущего ооцита, формирующейся блестящей зоны и слоя кубического, местами низко кубического, фолликулярного эпителия. Эпителий местами был уплощен. Блестящая зона определялась в виде тонкого неомогенного слоя бледно-розового цвета.

Ультраструктурное исследование органов экспериментальных животных в 1-й группе показало, что первичный фолликул снаружи был окружен уплощенным фолликулярным эпителием, расположенным на базальной мембране. В цитоплазме эпителиоцитов определялось ядро удлиненной формы, в котором были видны примаргинально расположенный гетерохроматин. Кариолема сохраняла целостность, иногда имела волнистый вид, а перинуклеарное пространство местами было слегка расширенным.

В цитоплазме фолликулярного эпителиоцита располагались крупные митохондрии (М), которые имели электроннопрозрачный матрикс и хорошо различимые кристы. Возле ядра были отмечены хорошо развитые элементы комплекса Гольджи (КГ), они различались в виде стопки уплощенных цистерн и мелких везикул. Канальцы гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС) были расширены и содержали в просвете хлопьевидный материал. Также в цитоплазме эпителиоцитов определялись лизосомы, свободные рибосомы и крупные липидные гранулы (ЛГ). Однорядный фолликулярный эпителий имел тонкую базальную мембрану (БМ), а сами эпителиоциты имели гладкую апикальную поверхность.

Расположенные под эпителием клетки внутреннего слоя теки имели вытянутую форму с тонкими отростками. В центре цитоплазмы у этих клеток находились полиморфные по форме митохондрии и канальцы ГЭС, а также мелкие лизосомы (рисунок 14) По периферии цитоплазмы клеток были видны микротрубочки и пиноцитозные везикулы.



М – митохондрии; Л – лизосомы; ГЭС – гранулярная эндоплазматическая сеть;  
ПП – пиноцитозные пузырьки

Рисунок 14 – Контроль. Фибробластоподобная клетка theca interna  
Электроннограмма ув. \*4000

При электронномикроскопическом исследовании первичных фолликулов 2-й группы отмечена полная деструкция ядра и всех отделов цитоплазмы фолликулов в форме разрывов (рисунок 15).



БМ – базальная мембрана

Рисунок 15 – Опыт. Деструкция цитоплазмы базального отдела эпителиальной клетки фолликула в форме разрыва. Электроннограмма ув. \*8000

При количественном подсчете примордиальных и первичных фолликулов в ткани яичников всех 4-х групп, мы получили результаты, представленные на рисунке 16.

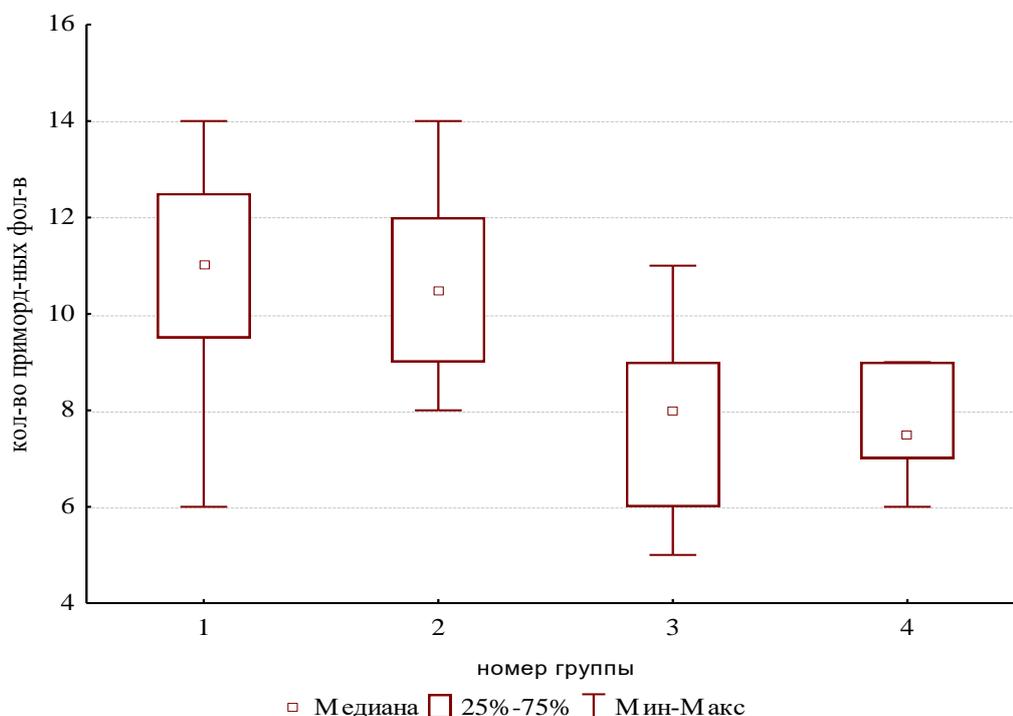


Рисунок 16 – Количество примордиальных фолликулов в разных группах

Из данного графика видно, что при сравнении количества примордиальных фолликулов во всех группах мы видим статистически значимые различия между группами 1 и 3, 1 и 4 (рисунок 17).

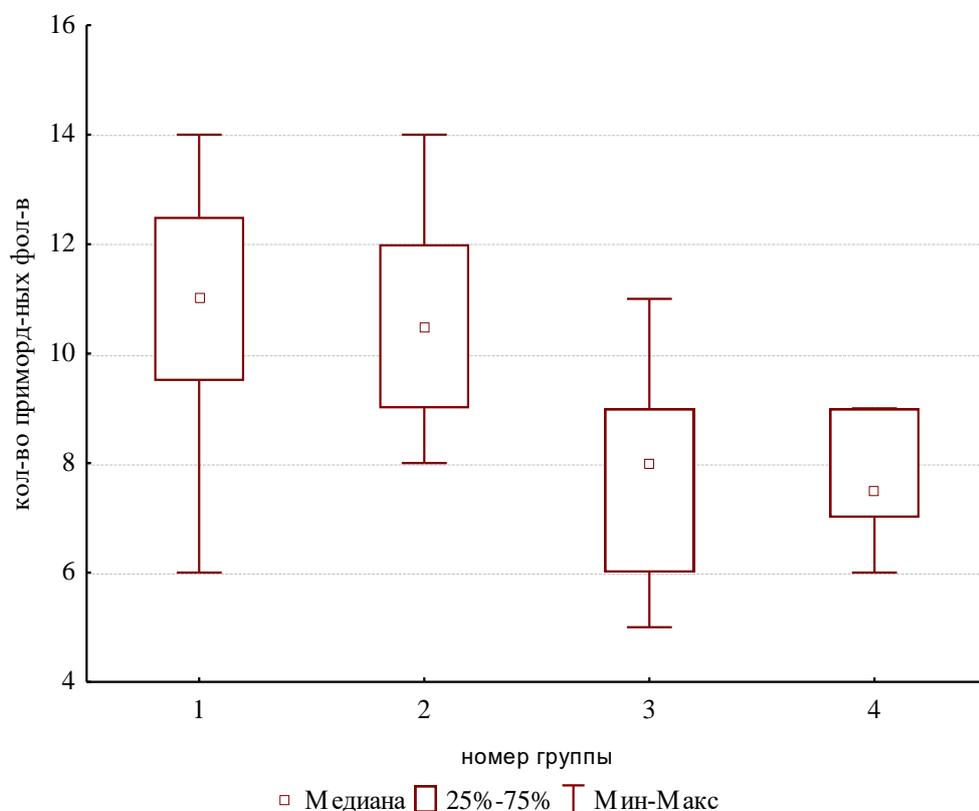


Рисунок 17 – Количество первичных фолликулов в разных группах

При анализе количественных значений фолликулов разной степени развития, установлено, что существуют статистически значимые различия в количестве первичных фолликулов между 1 и 3 группой ( $p=0,000$ ), между 1 и 4 группой ( $p=0,000$ ), между 2 и 3 группой ( $p=0,033$ ), между 2 и 4 группой ( $p=0,038$ ). Статистически значимые различия в количестве первичных фолликулов отсутствуют между 1 и 2 группами ( $p=0,664$ ), между 3 и 4 группами ( $p=1,000$ ).

Мы считаем, что отсутствие различий между 1-й и 2-й группами объясняется процессом оогенеза.

Яйцеклетки закладываются еще когда организм женской особи находится внутриутробно, а так как изначально мы брали интактных здоровых особей для 1-й и 2-й групп, то поэтому и количество первичных фолликулов в их яичниках не различается.

Однако после ингаляционной затравки второй группы, у их потомков происходит достоверное снижение количества первичных фолликулов. Это является плохим прогностическим критерием для данной особи, так как низкое количество первичных фолликулов говорит о сниженном овариальном резерве и возможном раннем или преждевременном начале менопаузы.

В группах 3 и 4 статистически значимых различий нет и это может говорить о том, что, так как фактор воздействия не поменялся, животные 3 группы подвергались тому же экологическому воздействию что и группа 2, поэтому они возможно на генетическом уровне передали количество первичных фолликулов своим потомкам. Это согласуется с теорией семейной предрасположенности к ранней и преждевременной менопаузе.

Помимо количественного определения первичных фолликулов, мы обнаружили, что часть первичных фолликулов была с микронуклеусами в ооцитах (рисунок 18).

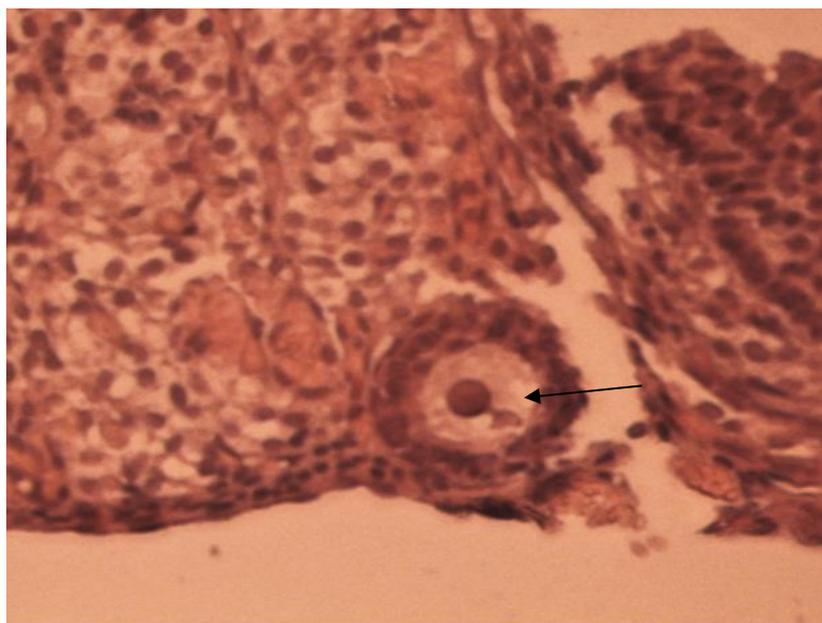


Рисунок 18 – Наличие микронуклеуса в первичном фолликуле яичника животного из 2-й группы

В таблице 13 представлены результаты наличия микроядер в первичных фолликулах в 1-й и 2-й группах.

Таблица 13 – Наличие микронуклеуса в первичном фолликуле яичников животных 1-й и 2-й группы абс.- %

Показатели	Группа – 1	Группа – 2	Всего изученных фолликулов
Микроядер не было	77-98,72	43-74,14	120
Микроядра были	1-1,28	15-25,86	16
Всего изученных фолликулов, абс.	78	58	136

Существуют статистически значимые различия в количестве первичных фолликулов с микронуклеосомами между 1 и 2 группой ( $\chi^2=19,36$ ;  $p=0,000$ ). Статистически значимых различий в количестве первичных фолликулов с микронуклеосомами между 2, 3 и 4 группами нет ( $\chi^2=2,394$ ;  $p=0,302$ ).

Так же мы оценивали наличие дегенерации ядра в 1-ом фолликуле по группам. Для сравнения этого показателя между 1 –й и 2-й группами мы использовали метод Pirsona (таблица 14).

Таблица 14 – Сравнение первичных фолликулов с дегенерацией ядра в группах 1 и 2

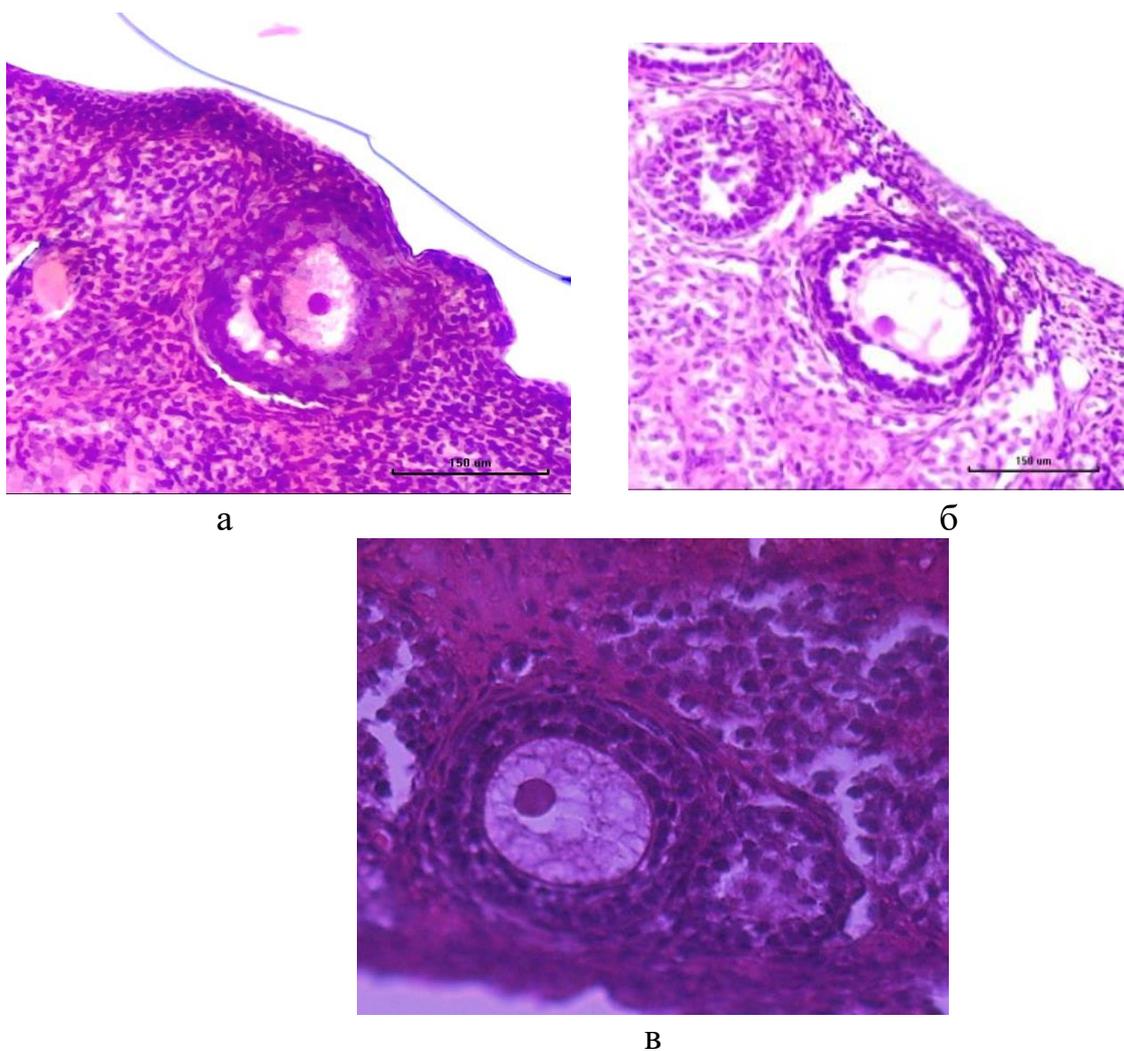
Показатель	Chi-square	df	p
Pearson Chi-square	6,996	df=1	p=0,008
Phi for 2 x 2 tables	0,227		
Примечание – Statistics: дегенерация ядра первичного фолликула (2) x номер группы (2) Include condition: v1<3			

В соответствии с таблицей 14 существуют статистически значимые различия в количестве первичных фолликулов с дегенерацией ядра между 1 и 2 группой ( $\chi^2=6,996$ ;  $p=0,008$ ). Однако при изучении различий между группами 2, 3 и 4 мы пришли к заключению, что статистически значимых различий в количестве первичных фолликулов с дегенерацией ядра между 2, 3 и 4 группами нет ( $\chi^2=1,047$ ;  $p=0,592$ ).

При морфологическом исследований на светооптическом уровне вторичные фолликулы во много раз превосходили по размерам примордиальные и первичные фолликулы. Фолликулярная жидкость, накапливающаяся в полости этих фолликулов, имела тенденцию к слиянию, хотя в некоторых случаях, в начале развития фолликула, определялись и в виде везикул разного размера.

При изучении вторичных фолликулов 2, 3 и 4 групп отмечается, что в фолликулярной жидкости некоторых фолликулов больший процент вакуолей, чем в первой группе, а в некоторых случаях фолликулярная жидкость полностью вакуолизирована.

Соединительная ткань вокруг вторичных фолликулов была уплотненной, формируя, по мере увеличения размера фолликула, теку. В соединительной ткани обнаруживались довольно многочисленные кровеносные сосуды (рисунок 19).

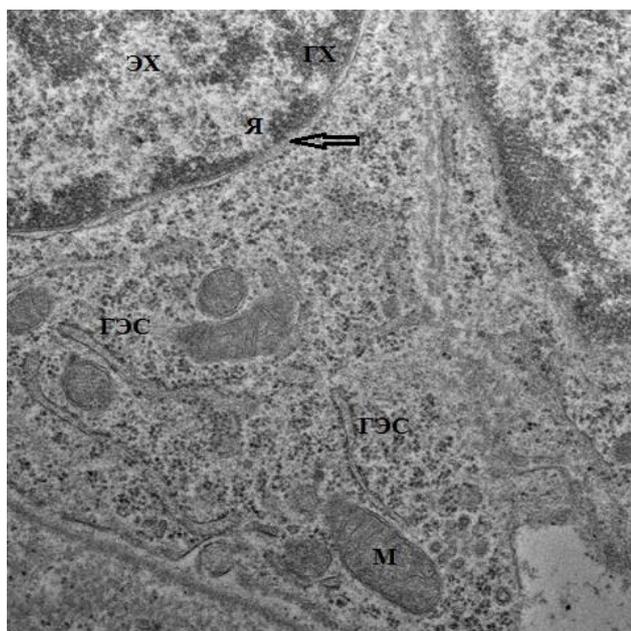


а – вторичный фолликул крысы из 2-й группы; б – вторичный фолликул крысы из 3-й группы; в – вторичный фолликул крысы из 4-й группы

Рисунок 19 – Вторичные фолликулы в яичниках самок крыс 2, 3, 4 групп.  
Окраска гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

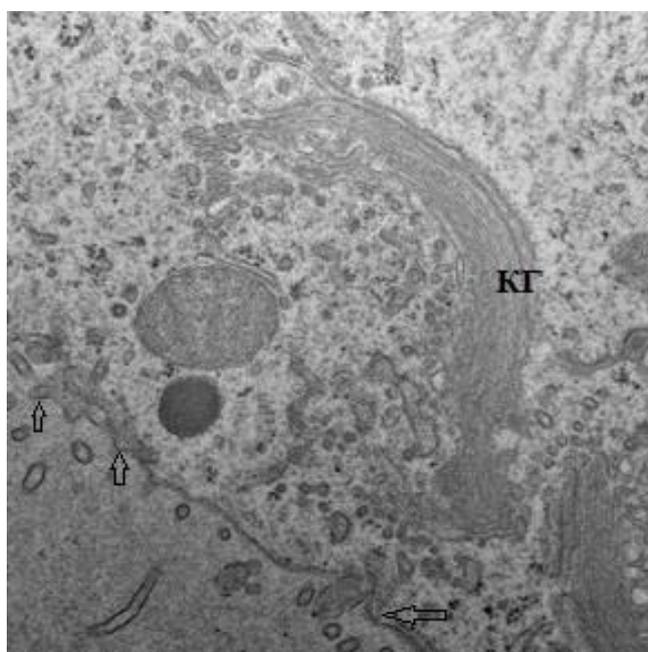
На электронномикроскопическом уровне фолликулярный эпителий вторичных фолликулов у животных 1-й группы был представлен несколькими слоями пролиферирующих эпителиальных клеток. Данные эпителиальные клетки характеризовались крупным ядром неправильной формы с высокой долей эухроматина и расширенным перинуклеарным пространством. Цитоплазма клеток содержала хорошо развитые каналцы гранулярной эндоплазматической сети, а также крупные по размерам митохондрии (рисунок 20).

В митохондриях хорошо различались кристы и матрикс органеллы. Слегка раздвинутые фолликулярной жидкостью клетки имели гладкую поверхность. Апикальная поверхность маргинально расположенных клеток характеризовалась мелкими отростками. Возле апикального полюса клетки располагались диктиосомы комплекса Гольджи (рисунок 21).



Я – ядро; ГХ – гетерохроматин; ЭХ – эухроматин; М – митохондрия; ГЭС – гранулярная эндоплазматическая сеть; стрелка – перинуклеарное пространство

Рисунок 20 – Контроль. Эпителиальная клетка развивающегося фолликула.  
Электроннограмма ув. \*400



КГ – комплекс Гольджи; стрелки – микроворсинки

Рисунок 21 – Контроль. Апикальная поверхность фолликулярной клетки  
Электроннограмма ув. \*8000

При статистической обработке количества вторичных фолликулов во всех исследуемых группах мы получили данные, представленные на рисунке 22 и таблице 15

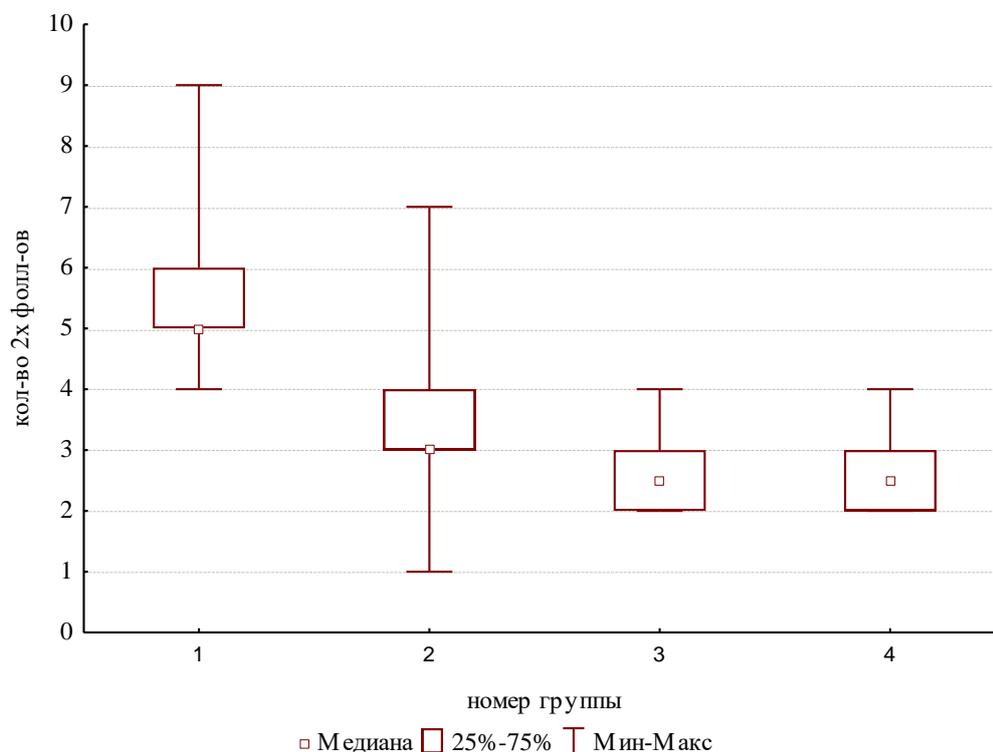


Рисунок 22 – Количество вторичных фолликулов в разных группах

Таблица 15 – Сравнение количества вторичных фолликулов в разных группах

Группы	1 - R:35,889	2 - R:21,650	3 - R:14,542	4 - R:14,700
1		0,058	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>
2	0,058		0,995	1,000
3	<b>0,000</b>	0,995		1,000
4	<b>0,001</b>	1,000	1,000	

Примечание – Kruskal-Wallis test:  $H=21,49129$   $p=0,0001$  Multiple Comparisons p values (2-tailed); кол-во 2х фолл-ов Independent (grouping) variable: номер группы

Таким образом, мы получили, что 1-ая и 2-ая группы по количеству вторичных фолликулов статистически значимо не отличаются между собой. Однако, имеется статистически значимое отличие между группами 1-й и 3-й, 1-й и 4-й.

Третичные фолликулы в органе животных на светооптическом уровне имели крупные размеры, хотя и были немногочисленными по количеству. В стенке фолликула различались соединительнотканый и клеточный слой.

Соединительнотканый слой был образован фибриллярными структурами, с небольшим количеством основного вещества и кровеносными сосудами. Внутренний слой был образован несколькими слоями базофильных клеток округлой формы с хорошо различимыми гиперхромными ядрами (рисунок 23).

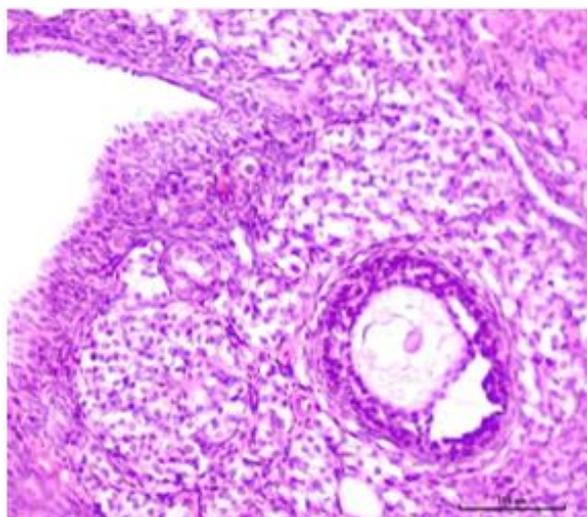


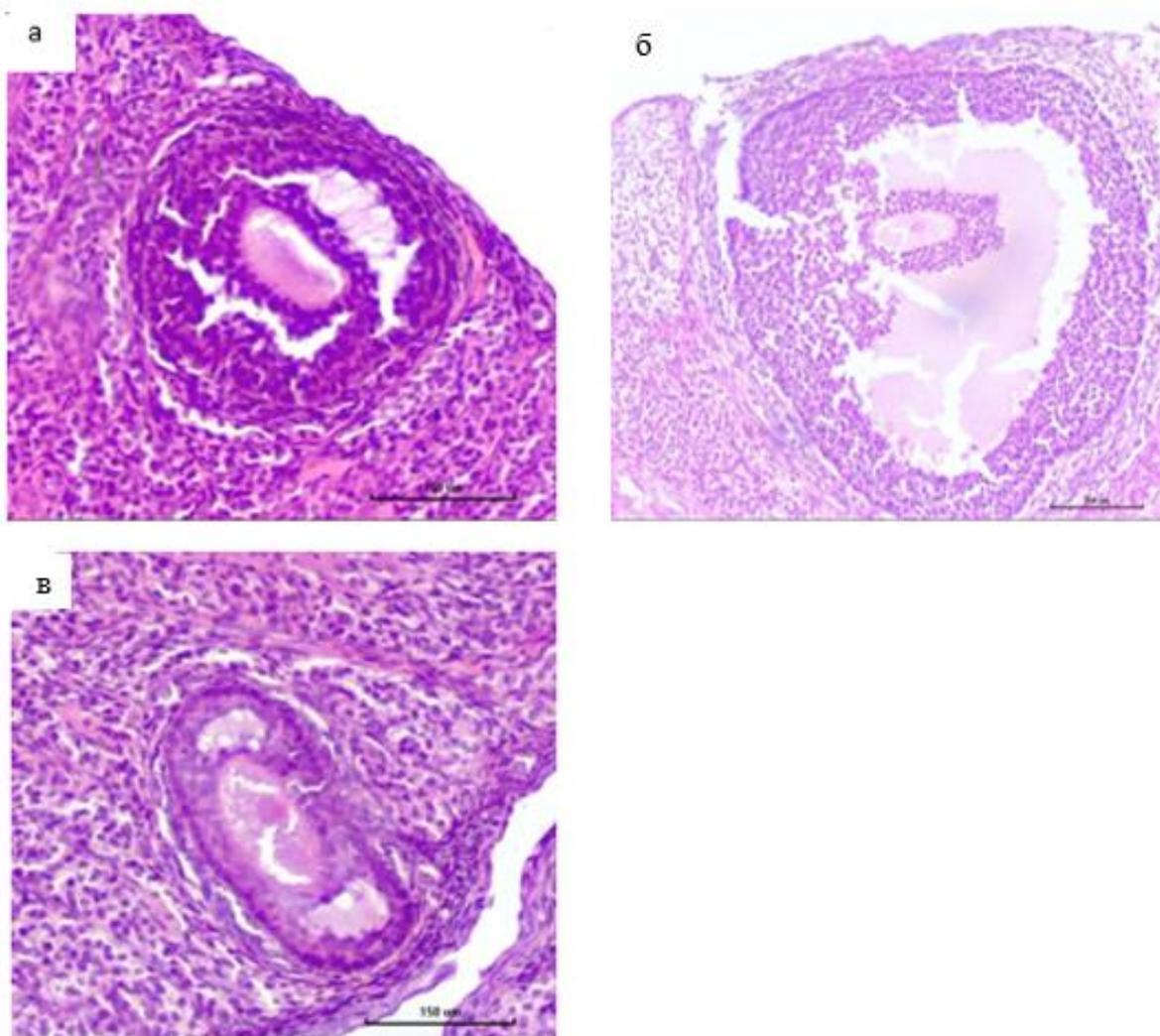
Рисунок 23 – Созревающий фолликул в яичнике самок крыс контрольной группы. Окраска гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

Цитоплазма клеток показывала базофильные свойства, цитоплазма имела нежную мелко-зернистую структуру и содержала различное количество везикул разного размера. В полости фолликула находилась жидкость с вакуолями разной величины. Яйцеклетка была окружена фолликулярными клетками, образующими лучистый венец, и прозрачной зоной. Сама яйцеклетка была оттеснена к периферии фолликула и в этой зоне имела контакт со стенкой фолликула, формируя таким образом яйценосный бугорок.

Третичные фолликулы в органе животных опытной группы встречались не во всех случаях. В единичных случаях они имели большие размеры, хотя и не достигали размеров этих же структур в контрольной группе.

В стенке фолликула различались соединительнотканная тека и гранулезный слой. Соединительнотканый слой теки был образован фибриллярными структурами, с небольшим количеством основного вещества, обнаруживаемого между фибриллами, и кровеносными сосудами. Кровеносные сосуды чаще выглядели полнокровными, в то же время интима некоторых из них была с явлениями дисморфизма.

Внутренний слой теки смотрелся рыхлым и был образован несколькими слоями базофильных мелкозернистых клеток округлой формы. Ядра клеток хорошо различались и были гиперхромными. Цитоплазма клеток была умеренно базофильна, имела мелко-зернистую структуру. Некоторые клетки не имели связи между собой и лежали отдельно. Полость фолликула содержала небольшое количество жидкости (рисунок 24)



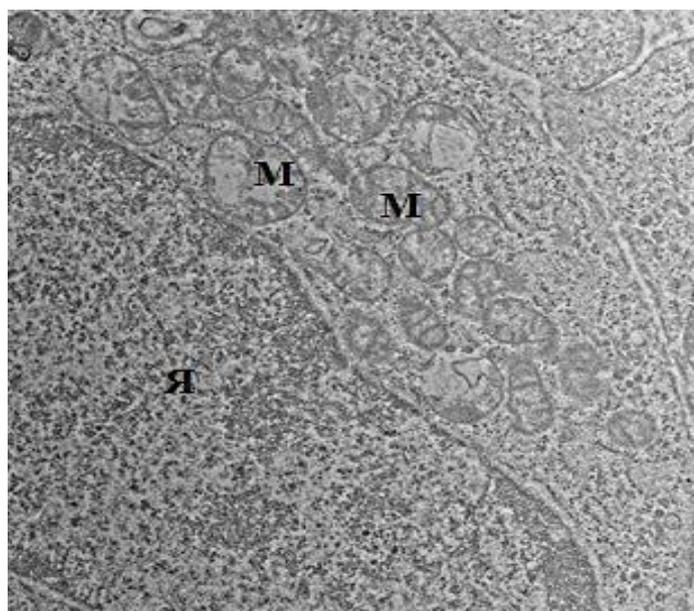
а – вторая группа; б – третья группа; в – четвертая группа

Рисунок 24 – Третичный фолликул опытных групп

Яйцеклетка окружена фолликулярными клетками небольших размеров, образующими лучистый венец, и тонкой прозрачной зоной. Сама яйцеклетка была оттеснена к периферии фолликула, формируя, таким образом, яйценосный бугорок.

На электронномикроскопическом уровне созревающие крупные фолликулы имели большое количество слоев клеток, отмечались структурой эпителия. Крупные ядра содержали эухроматин, в цитоплазме резко увеличивалось содержание митохондрий, ГЭР и полирибосом (рисунок 25).

Расположенная в центре фолликулов яйцеклетка имела крупное бледное ядро и цитоплазму с многочисленными желточными зернами. Очень часто яйцеклетка не попадала в плоскость ультратонкого среза фолликула, чаще она обнаруживалась на полутонких срезах.



Я – ядро; М – митохондрии

Рисунок 25 – Контроль. Эпителиальная клетка созревшего фолликула. Электроннограмма ув. \*8000

При сравнительном анализе количества третичных фолликулов во всех исследуемых группах, мы получили данные представленные на рисунке 26 и таблице 16.

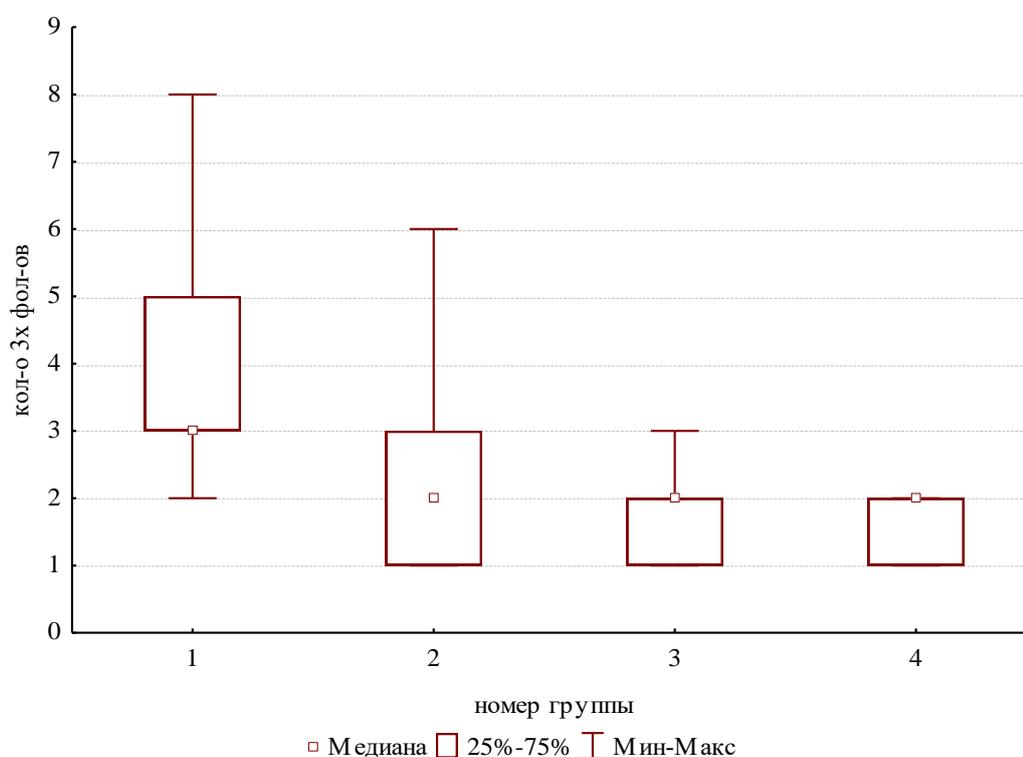


Рисунок 26 – Количество третичных фолликулов в разных группах

Таблица 16 – Сравнение количества третичных фолликулов по группам

Группы	1 - R:29,278	2 - R:18,556	3 - R:15,600	4 - R:12,944
1		0,214	<b>0,036</b>	<b>0,008</b>
2	0,214		1,000	1,000
3	<b>0,036</b>	1,000		1,000
4	<b>0,008</b>	1,000	1,000	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(3, N=37) = 13,06636$ $p = 0,0045$				

Статистическая обработка данных по третичным фолликулам, представленная на рисунке 26 и таблице 16 указывает на то, что статистически значимые различия наблюдаются только между группами 1 и 3, и группами 1 и 4 ( $p=0,0045$ ).

Анализируя статистическую обработку по количеству вторичных и третичных фолликулов, мы пришли к выводу, что стадийность созревания фолликулов у животных, которые впервые были затравлены пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря, не нарушена. Однако, имеется статистически значимая тенденция к снижению созревающих фолликулов при ингаляционной затравке следующих поколений. Что в свою очередь говорит нам о возможном снижении репродуктивного потенциала следующих поколений при неизменном проживании в данном регионе.

Кроме созревающих фолликулов в структуре яичников имеются также атретичные фолликулы (атретическое тело). Атретический фолликул – это временная эндокринная железа в структуре яичника, который образовался из растущих фолликулов, подвергнутого обратному развитию. В нем имеются признаки гибели ооцита и фолликулярных клеток, а также снижения количества фолликулярной жидкости.

Превращение созревающего фолликула в атретичный на разных этапах развития происходит в физиологических условиях, в процессе отбора доминирующего фолликула. Однако, атрезия фолликула может быть и следствием неблагоприятных факторов, и даже третичные фолликулы перед самой овуляцией могут стать атретичными.

В опытной группе атретические тела встречаются чаще, чем в группе контроля (рисунок 27). Они были меньшими по объему и чаще неправильной формы. В центре имели остатки блестящей оболочки в виде плотной массы светло-розового цвета. Снаружи были покрыты тонким слоем плотной соединительной ткани (рисунок 28).

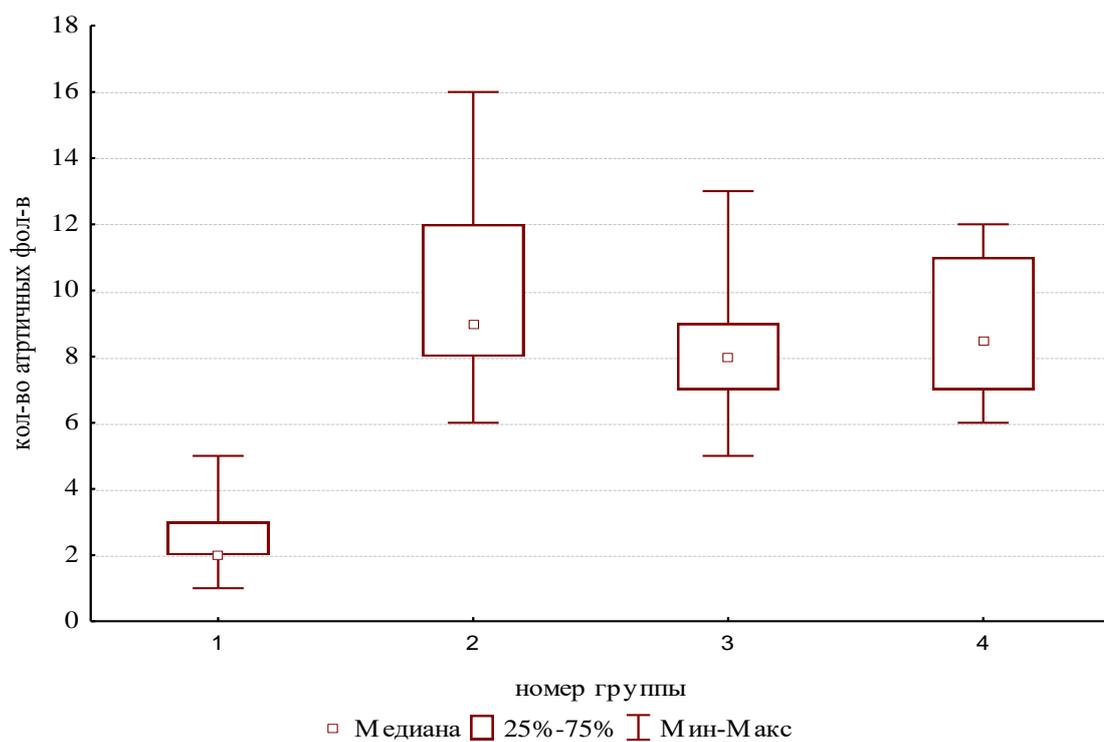
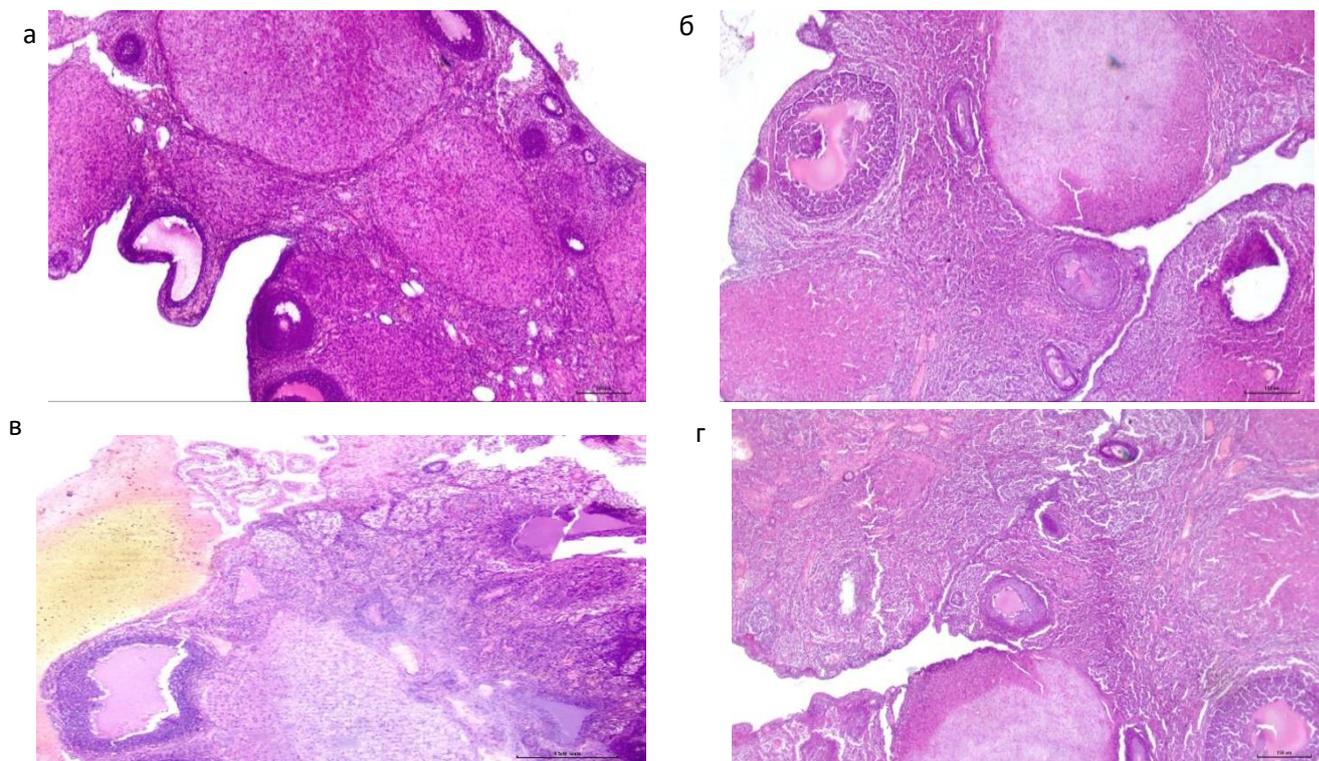


Рисунок 27 – Количество атретичных фолликулов в разных группах



а – контрольная группа; б – вторая группа; в – третья группа; г – четвертая группа

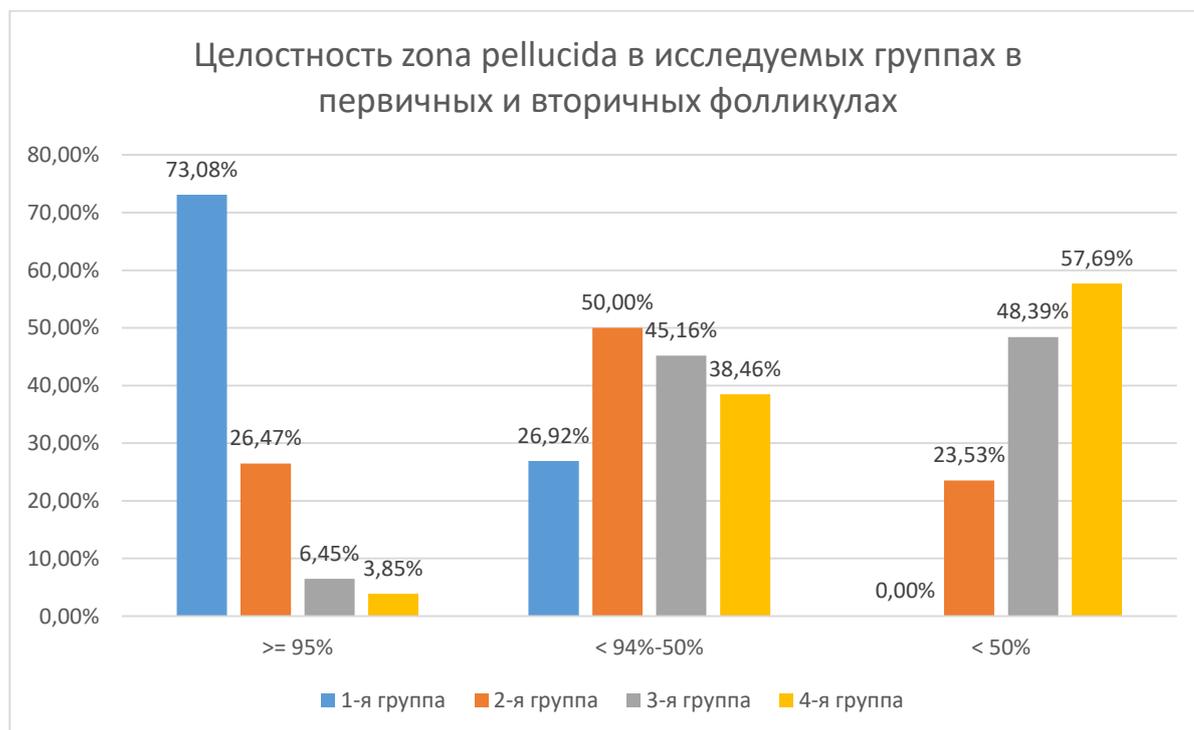
Рисунок 28 – Атретические фолликулы в ткани яичников

В отличие от данных по количеству вторичных и третичных фолликулов в различных группах, по количеству атретичных фолликулов между 1-й группой и всеми опытными группами имеется статистически значимое различие ( $p = ,0001$ ). Однако, отличий между поколениями не наблюдается (таблица 17).

Таблица 17 – Сравнение количества атретичных фолликулов по группам

1 - R:5,0556	2 - R:27,900	3 - R:23,292	4 - R:25,700
	0,000	0,003	0,001
0,000		1,000	1,000
0,003	1,000		1,000
0,001	1,000	1,000	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(3, N=41) = 21,51817$ $p = ,0001$			

Кроме того, в некоторых первичных и вторичных фолликулах мы наблюдали нерегулярную zona pellucida. Целостность zona pellucida оценивалась так же в процентах.



1 – группа контрольные животные 2 – группа-затравленные животные; 3 – группа- затравленные животные(F1); 4 – группа- затравленные животные(F2)

Рисунок 29 – Целостность zona pellucida в исследуемых группах в первичных и вторичных фолликулах, представленная в %

Из рисунка 29 видно, что в 1-й группе целостность zona pellucida не снижается меньше 50 %, а в группе 3 и 4 целостность границы zona pellucida меньше половины встречается почти на 25% и 34% соответственно чаще, чем во второй группе.

Статистически значимые различия присутствуют по объему zona pellucida между 1 и 2 группой, между 1 и 3 группой, между 1 и 4 группой, между 2 и 3 группой, между 2 и 4 группой. Между 3 и 4 группой статистических различий по данному показателю нет (таблица 18)

Таблица 18 – Статистические критерии сравнения между изучаемыми группами целостности zona pellucida (Chi-square)

Статистический критерий	Сравнение между группами					
	1-й и 2-й группой *	1-й и 3-й группой *	1-й и 4-й группой*	2-й и 3-й группой**	2-й и 4-й группой ***	3-й и 4-й группой ****
Pearson Chi-square	23,44	44,97	47,36	6,751	9,477	0,566
Cramer's V	0,522	0,736	0,779	0,322	0,397	0,099
df=2; *p=0,000; **p=0,034; ***p=0,009; ****p=0,754						

Значимость целостности zona pellucida заключается в ее функции. Она состоит из нескольких гликопротеидов (разное количество у разных видов млекопитающих) и играет роль защитника ооцита, предотвращает полиспермию и преждевременную имплантацию оплодотворенной клетки. Один гликопротеид из которого состоит zona pellucida перед оплодотворением связывает сперму до образования акросомальной реакции и оплодотворения, после чего он протеолитически расщепляется, образуя блок для проникновения других сперматозоидов. Если zona pellucida нарушена, то оплодотворение яйцеклетки может произойти двумя сперматозоидами. В таком случае может образоваться триплоидный набор хромосом [177].

Так же вся zona pellucida является мембраной, через которую происходит транспорт активных и питательных веществ между ооцитом и окружающими его фолликулярными клетками. После оплодотворения zona Pellucida образует слой гидрогеля вокруг эмбриона, что позволяет сохранять стереоструктурное расположение клеток и правильное его развитие. В норме у человека zona Pellucida разрывается и происходит высвобождение бластоцисты на 5-й день, когда бластоциста уже находится в полости матки. Это позволяет эмбриобласту адгезировать в эндометрий и получать больше питательных веществ [178].

Если разрыв zona Pellucida происходит раньше, то произойдет преждевременная имплантация оплодотворенной клетки и развивается внематочная беременность. В работах, посвященных изучению результатов ЭКО, описывается, что жизнеспособные бластоцисты имели нормальную ультраструктуру наружной поверхности ZP, тогда как поврежденные

нездоровые бластоцисты показали измененную внешнюю поверхность ZP, сравнимую с таковой у незрелых / атретических ооцитов [179].

Таким образом, из полученных нами данных мы видим, что протяженность zona Pellucida в опытных группах меньше, по сравнению с контрольной группой, что, возможно, является одной из причин меньшего количества приплода у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой.

Одновременно с другими показателями, мы изучали вакуолизацию фолликулярной жидкости в первичных, вторичных и третичных фолликулах во всех исследуемых группах. В фолликулярной жидкости содержатся половые гормоны, в частности эстрогены, и, если жидкость не гомогенная, то можно говорить об предположительной эстрогенной недостаточности. А так как эстроген необходим для морфогенеза тканей плаценты и матки, роста сосудов необходимого для дальнейшего питания плода, то становится очевидным, что недостаток этого гормона напрямую связан с прогрессированием беременности [175]. Эстроген синтезируется из андрогена в клетках гранулезы под действием ароматазы, вырабатываемой клетками Theca interna. Результаты изучения вакуолизации фолликулярной жидкости в первичных фолликулах во всех группах представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Площадь вакуолизированной фолликулярной жидкости в первичных фолликулах в 1, 2, 3 и 4-ой группах (абс.-%)

Площадь вакуолизации фолликулярной жидкости	Группа № 1	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 4	Всего изучено фолликулов
<5%	50-64,10%	9-16,36%	7-18,42%	3-9,38%	69
5 до 50 %	26-33,33%	24-43,64%	18-47,37%	16-50,00%	84
>50 %	2-2,56%	22-40,00%	13-34,21%	13-40,63%	50
Всего	78	55	38	32	203

Из таблицы 19 видно, что площадь вакуолизированной жидкости, занимающая более 50 % всей площади фолликулярной жидкости чаще всего встречается в группе 2 и 4. В 1-й группе животных вакуолизация в 64,1% не достигает 5% площади. Это говорит о достаточной эстрогенной насыщенности у животных первой группы. Для выяснения значимости полученных результатов, мы провели статистический анализ (таблица 20).

Таблица 20 – Межгрупповое сравнение по объему вакуолизации фолликулярной жидкости первичных фолликулов

Группы	Показатель	Chi-square	df	p
1 и 2	Pearson Chi-square	<b>42,53</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,000</b>
	Cramer's V	<b>0,566</b>		
1 и 3	Pearson Chi-square	<b>31,97</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,000</b>
	Cramer's V			
1 и 4	Pearson Chi-square	<b>39,86</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,000</b>
	Cramer's V	<b>0,602</b>		
2 и 3	Pearson Chi-square	<b>0,325</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,850</b>
	Cramer's V	<b>0,059</b>		
2 и 4	Pearson Chi-square	<b>0,896</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,639</b>
	Cramer's V	<b>0,102</b>		
3 и 4	Pearson Chi-square	<b>1,212268</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,54546</b>
	Cramer's V	<b>0,1315983</b>		

Первая группа статистически значимо отличается от всех остальных групп по объему вакуолизации фолликулярной жидкости в первичных фолликулах. Между остальными исследуемыми группами статистически значимых различий по исследуемому параметру нет (при  $p=0,05$ ).

Таблица 21 – Площадь вакуолизированной фолликулярной жидкости во вторичных фолликулах в 1, 2, 3 и 4-ой группах (абс.-%)

Площадь вакуолизации фолликулярной жидкости	Группа № 1	Группа №2	Группа № 3	Группа № 4	Всего изучено фолликулов
<5%	40-76,92%	6-17,65%	0-0,00%	2-7,69%	48
5 до 50 %	10-19,23%	22-64,71%	20-64,52%	15-57,69%	67
>50 %	2-3,85%	6-17,65%	11-35,48%	9-34,62%	28
Всего	52	34	31	26	143

В таблице 21 показано, что чаще всего вакуолизация, занимающая больше половины площади фолликулярной жидкости, встречается в 3 –й и 4-й группах (35,48 и 34,62% соответственно). Видно, что фолликулярная жидкость без вакуолей или с наименьшим ее количеством практически не встречается в опытных 2, 3, 4 группах.

При статистическом сравнении объема вакуолизации фолликулярной жидкости вторичных фолликулов, мы выявили, что 1 группа статистически

значимо отличается от всех остальных групп. Также достоверные отличия имеются между группами 2 и 3.

Однако, между остальными исследуемыми группами статистически значимых различий по исследуемому параметру нет.

Возможно, это объясняется некоторым привыканием особей первого поколения к токсическому воздействию ингаляционной затравки пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря и выработкой определенных защитных механизмов на клеточном уровне (таблица 22).

Таблица 22 – Межгрупповое сравнение по объему вакуолизации фолликулярной жидкости вторичных фолликулов

Сравниваемые группы	Показатель	Chi-square	df	p
1 и 2	Pearson Chi-square	29,14	df=2	p=0,000
	Cramer's V	0,582		
1 и 3	Pearson Chi-square	47,277	df=2	p=0,000
	Cramer's V	0,755		
1 и 4	Pearson Chi-square	35,06	df=2	p=,000
	Cramer's V	0,670		
2 и 3	Pearson Chi-square	35,06	df=2	p=,000
	Cramer's V	0,670		
2 и 4	Pearson Chi-square	2,909	df=2	p=0,233
	Cramer's V	0,220		
3 и 4	Pearson Chi-square	2,494	df=2	p=0,287
	Cramer's V	0,209		

Результаты оценки вакуолизации фолликулярной жидкости в третичном фолликуле по всем изучаемым группам представлены в таблице 23, из которой видно, что даже в контрольной группе вакуолизация площадью <5% встречается только в половине случаев. Возможно, это объясняется тем, что не все фолликулы достигнувшие зрелости далее будут овулировать. Часть из них в дальнейшем атрезируется, и, вакуолизация в данном случае физиологический этап. Однако, стоит отметить, что в группе 4- более 78% третичных фолликулов имеют вакуоли площадью более 50%. Это говорит о том, что процессы синтеза гормонов также могут быть нарушены и во втором поколении.

Таблица 23 – Площадь вакуолизированной фолликулярной жидкости во третичных фолликулах в 1, 2, 3 и 4-ой группах (абс.-%)

Площадь вакуолизации фолликулярной жидкости	Группа № 1	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 4	Всего изучено фолликулов
<5%	18-50,00%	5-23,81%	0-0,00%	0-0,00%	23
5 до 50 %	13-36,11%	6-28,57%	9-50,00%	3-21,43%	31
>50 %	5-13,89%	10-47,62%	9-50,00%	11-78,57%	35
Всего	36	21	18	14	89

В таблице 24 показано, что 1 группа статистически значимо отличается от всех остальных групп по объему вакуолизации фолликулярной жидкости в третичных фолликулах. Между остальными исследуемыми группами статистически значимых различий по исследуемому параметру нет.

Таблица 24 – Межгрупповое сравнение по объему вакуолизации фолликулярной жидкости третичных фолликулов

Сравниваемые группы	Показатель	Chi-square	df	p
1 и 2	Pearson Chi-square	<b>8,215</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,016</b>
	Cramer's V	<b>0,380</b>		
1 и 3	Pearson Chi-square	<b>15,60</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,000</b>
	Cramer's V	<b>0,538</b>		
1 и 4	Pearson Chi-square	<b>20,86</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,000</b>
	Cramer's V	<b>0,646</b>		
2 и 3	Pearson Chi-square	<b>5,454</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,065</b>
	Cramer's V	<b>0,374</b>		
2 и 4	Pearson Chi-square	<b>4,841</b>	<b>df=2</b>	<b>p=0,089</b>
	Cramer's V	<b>0,372</b>		
3 и 4	Pearson Chi-square	<b>2,743</b>	<b>df=1</b>	<b>p=0,098</b>
	Cramer's V	<b>0,293</b>		

При межгрупповом статистическом сравнении групп по объему вакуолизации фолликулярной жидкости в первичных фолликулах мы установили, что имеются статистически значимые различия между контрольной группой и группой затравленных животных. Однако, нет различий между поколениями. Несмотря на это, 1 группа статистически значимо отличается от всех остальных групп по объему вакуолизации фолликулярной жидкости во

вторичных фолликулах. 2 и 3 группа отличаются по объему вакуолизации фолликулярной жидкости во вторичных фолликулах. Между остальными исследуемыми группами статистически значимых различий по исследуемому параметру нет.

Мы полагаем, что данные результаты объясняются тем, что первичные фолликулы расположены глубоко в корковом слое яичников, и таким образом защищены от значительного воздействия внешних факторов, приводящих к изменениям функции гранулезных клеток и компенсаторные механизмы, пока нами не изученные, позволяют синтезировать фолликулярную жидкость, соответственно и эстроген, в достаточном количестве. В то же время во вторичных фолликулах имеются различия не только с контрольной группой, но и между поколениями, это говорит о том, что при развитии уже поврежденных первичных фолликулов во вторичные, под воздействием пыли – солевых аэрозолей Аральского моря происходит срыв адаптационных механизмов и нарушается процесс синтеза эстрогена.

Таким образом, проведя анализ таблицы 20, 22, 24, 24 следует, что во всех случаях, вакуолизация фолликулярной жидкости статистически значимо отличается от остальных групп только в 1-й группе. То есть данный показатель значимо отличается в контрольной группе от опытной группы и от групп 1-го и 2-го поколения. Что, вероятнее всего, говорит о недостаточной продукции гормона эстрогена у животных, подвергнутых ингаляционной заправке пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря в течении 30 дней.

Желтое тело яичника – это жизненно важная временная эндокринная структура, которая находится в яичнике и играет решающую роль в развитии фертильности во вторую фазу менструального цикла. В клетках желтого тела, в основном синтезируется гормон прогестерон, а также ингибин А и эстрадиол. Поэтому посредством обратной связи желтое тело регулирует выработку гонадотропин-рилизинг-гормона из гипоталамуса, следовательно, уменьшается выброс ФСГ и ЛГ гипофизом. Подготавливается благоприятная среда в эндометрии для возможной имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Так как желтое тело состоит из большого количества разных клеток по структуре и функции, то щелевые соединения между этими клетками играют очень большую роль, потому что обеспечивают регуляцию функций всех этих типов клеток [179, p. 459].

Важной частью развития желтого тела является его адекватное кровоснабжение. Считается, что кровоснабжение зрелого желтого тела является самым высоким на единицу ткани любого органа в организме. Поэтому так важно правильное и достаточное развитие сосудистой сети в данном органе [180, 181]. В нашем эксперименте желтые тела у животных в 1-й группе визуально были крупнее по размерам и примерно одинаковыми между собой. Строение желтых тел соответствовало классическому и состояло из полигональных клеток с нежно – зернистой цитоплазмой и с округлым ядром в центре. По периферии желтого тела лютеоциты были более мелкими, расположены были ближе друг к (рисунок 30).

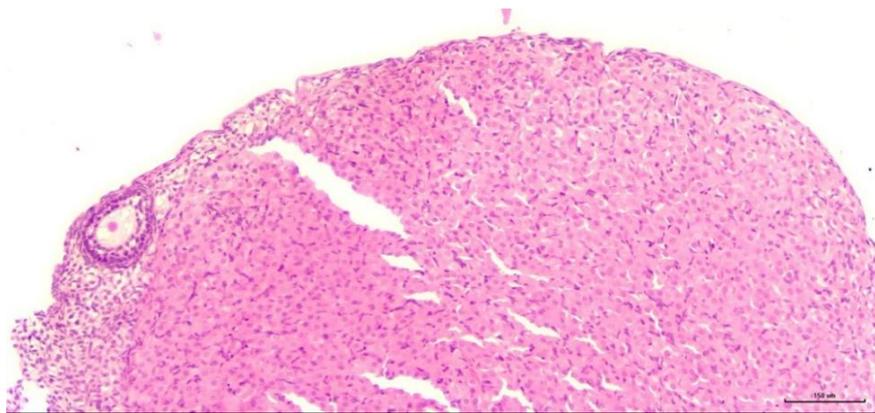


Рисунок 30 – Желтое тело в яичнике самок крыс контрольной группы. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

Центральная зона желтого тела состояла из клеток более крупных по размерам, между тяжами которых располагались кровеносные капилляры, которые чаще были запустевшими. Ядра лютеоцитов хорошо различались вследствие выраженной базофилии и определялись в центре клетки. Изредка встречались единичные клетки со сравнительно низкой базофилией цитоплазмы (рисунок 31).

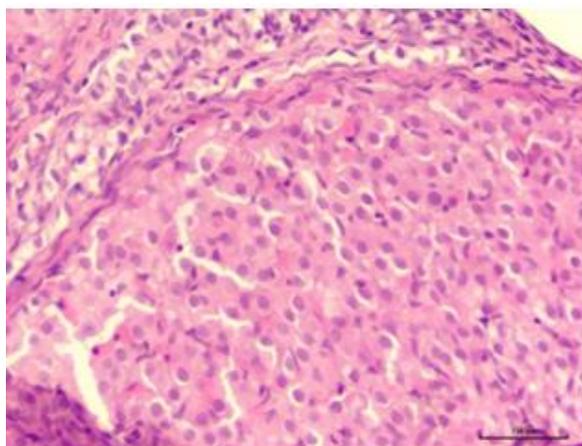
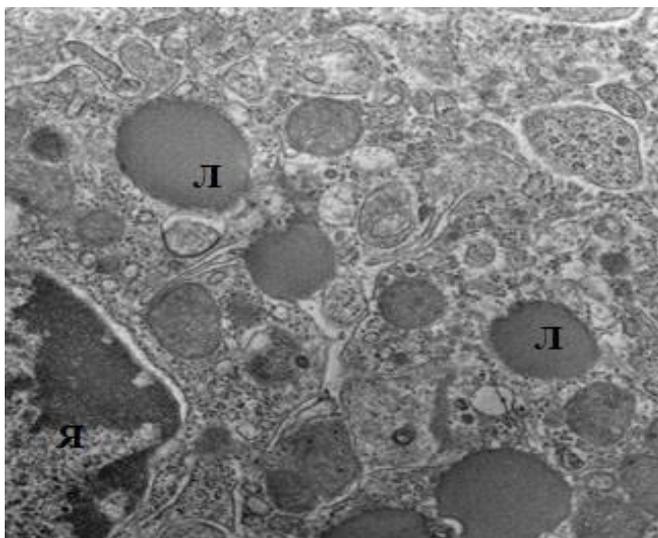


Рисунок 31 – Желтые тела в яичниках самок крыс контрольной группы. Четкие очертания границ клетки, ярко прокрашенное целое ядро. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

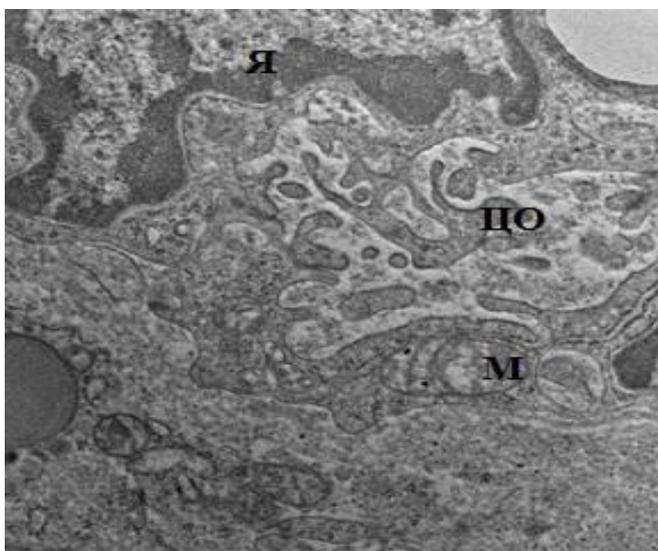
На электронномикроскопическом уровне лютеиновые клетки в ткани яичников животных 1-й группы содержали крупные митохондрии с везикулярными кристами и липидные гранулы гомогенной структуры повышенной электронной плотности (рисунок 32).

Кровеносные капилляры имели сохранные эндотелиальные клетки с крупным ядром и хорошо развитыми органеллами (рисунок 33). Апикальная поверхность была снабжена тонкими цитоплазматическими выростами.



Л – крупные липидные включения; Я – ядро

Рисунок 32 – Контроль. Лютеиновая клетка стромы. Электроннограмма ув. \*8000



Я-ядро; М-митохондрия; ЦО – цитоплазматические отростки

Рисунок 33 – Эндотелий кровеносного капилляра стромы. Контрольная группа. Электроннограмма ув. \*8000

Желтые тела в опытной группе визуально смотрелись меньше соответствующих структур контрольной группы, а также были разными по размерам и, по-видимому, находились на разных стадиях развития.

Они были образованы небольшими клетками полигональной формы, ядра которых определялись чаще в центре, реже эксцентрично. По форме ядра были округлыми, иногда неправильной формы. По периферии желтого тела лютеоциты расположены ближе друг к другу, а в центральной зоне в некоторых из них наблюдалось более рыхлое расположение клеток и отдельные клетки имели явления дисморфизма (рисунок 34).

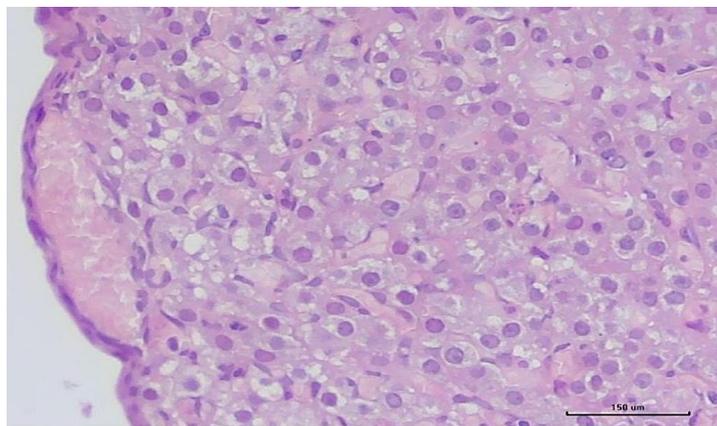


Рисунок 34 – Желтое тело яичника самок крыс опытной группы. Наблюдается вакуолизация цитоплазмы лютеоцитов, в некоторых клетках определяется кариолизис. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

Дисморфизм лютеоцитов выражался вакуолизацией цитоплазмы, смещением ядра от центра, изменением контура ядер, изрезанностью их, иногда и явлениями кариолизиса. Кровеносные сосуды между лютеоцитами чаще были полнокровными (рисунок 35).

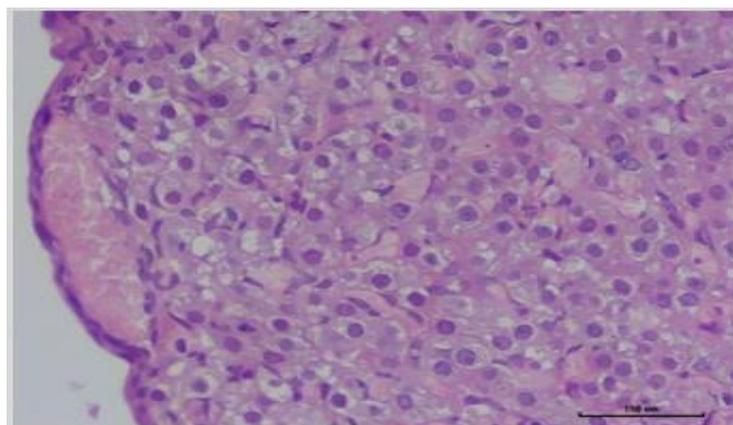


Рисунок 35 – Желтые тела яичника самок крыс опытной группы. Нарушение кровообращения, застой в кровеносных сосудах. Вакуолизация цитоплазмы лютеоцитов. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40

При электронном микроскопировании лютеиновых клеток ткани яичников опытных групп, лютеиновые клетки характеризовались выраженной утилизацией липидов (рисунок 36). В цитоплазме скапливался лютеиновый пигмент. Липидные гранулы светились и сливались, превращаясь в

неоформленные структуры, заполняющие почти весь объем клетки (рисунок 37). Многие лютеиновые клетки были разрушены (рисунок 38). Мелкие кровеносные сосуды были некротизированы (рисунок 39). Стенка капилляра представляла массу некротизированного материала разрушенных органелл. Эндотелий артериол был перпендикулярно вытянут по отношению к длиннику сосуда и часто некротизирован.

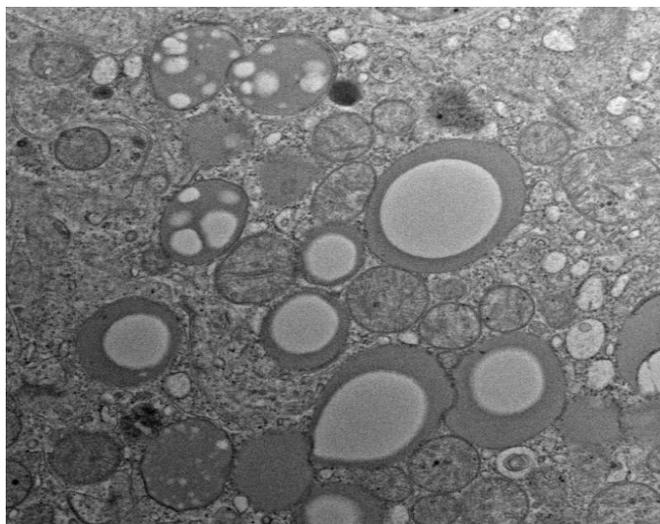


Рисунок 36 – Опыт. Цитоплазма липидов в гранулах. Электроннограмма ув. \*8000

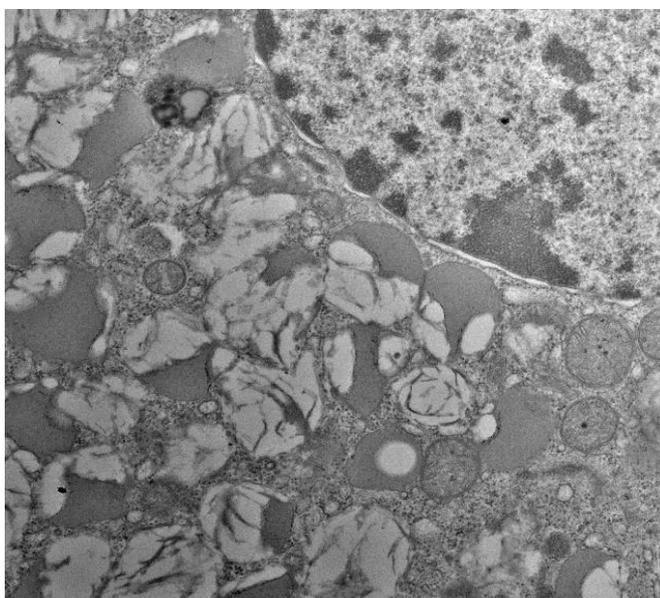


Рисунок 37 – Опыт. Крупные сливающиеся структуры на месте утилизированных липидных гранул. Электроннограмма ув. \*8000

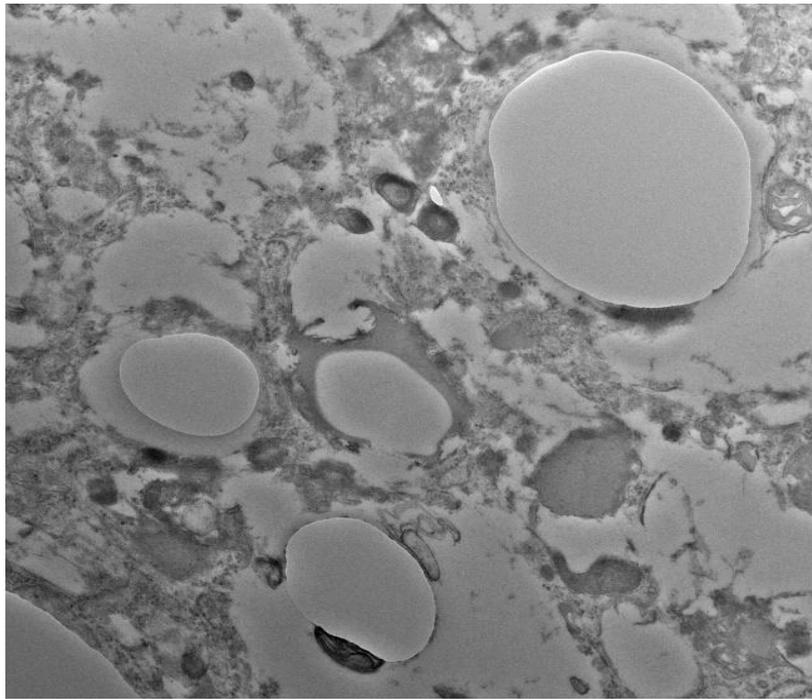


Рисунок 38 – Опыт. Полное разрушение лютеиновых клеток.  
Электроннограмма ув. \*6000

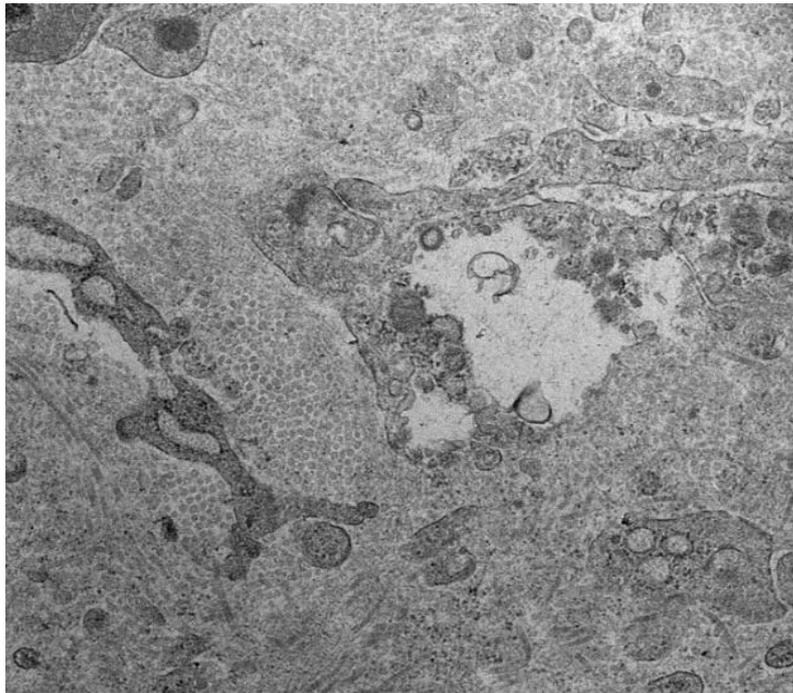


Рисунок 39 – Опыт. Отек, некроз эндотелия кровеносного капилляра.  
Электроннограмма ув. \*6000

В таблице 25 представленные средние размеры желтых тел по группам.

Таблица 25 – Описательные статистики размеров желтых тел у животных исследуемых групп

Группа	n	Среднее	Нижняя граница 95%	Верхняя граница 95%	Медиана	Минимум	Максимум	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Стандартное отклонение
1	83	557468,6	509483,7	605453,4	569374,2	106893,7	1247036	382455,2	680407,4	219755,1
2	65	476646,2	395478,5	557813,9	398567,6	41960,90	1626872	264785,3	644640,8	327569,1
3	62	284018,8	246673,5	321364,1	255619,5	36591,06	700164,4	202345,6	331649,8	147056,4
4	44	330097,0	283240,2	376953,9	277522,0	172105,2	876019,8	242388,8	357022,4	154120,2

Для оценки статистической значимости отличий по размерам желтых тел между группами, мы проверили распределение данных внутри групп на нормальность. Оно отличное от нормального. Следовательно, для сравнения значений группы 1 и 2 мы использовали критерий Манна- Уитни (таблица 26, рисунок 40).

Таблица 26 – Результаты сравнения размеров желтого тела у животных 1 и 2 групп

Показатель	Rank Sum - Group 1	Rank Sum - Group 2	U	Z	p-level	Z - adjusted	p-level	Valid N - Group 1
Размер желтого тела яичника у крыс	6929,000	4097,000	1952,000	2,880378	0,003972	2,880378	0,003972	83

Примечание – U-критерий Манна-Уитни, для  $\alpha=0,05$  Mann-Whitney U Test (Желтые тела) By variable номер группы  
Marked tests are significant at  $p < 0,05000$

Из представленной таблицы видно, что 1 и 2 исследуемые группы статистически значимо отличаются по размеру желтого тела ( $p=0,004$ ). У 2 группы размеры желтых тел уменьшаются.

Распределение значений в опытных группах также было отличным от нормального, поэтому мы использовали метод Краскелла Уоллиса. Результаты представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Множественные сравнение 2, 3 и 4 групп по размерам желтого тела, р-уровни

Группы	2 - R:105,29	3 - R:68,581	4 - R:82,045
2		0,000	0,048
3	0,000		0,503
4	0,048	0,503	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(2, N=171) = 17,82682$ $p = 0,0001$			

Существуют статистически значимые различия между 2 и 3 группой ( $p=0,000$ ) и между 2 и 4 группой ( $p=0,048$ ). Вместе с тем 3 и 4 группа статистически значимо не различаются по размеру желтого тела ( $p=0,503$ ) (рисунок 40).

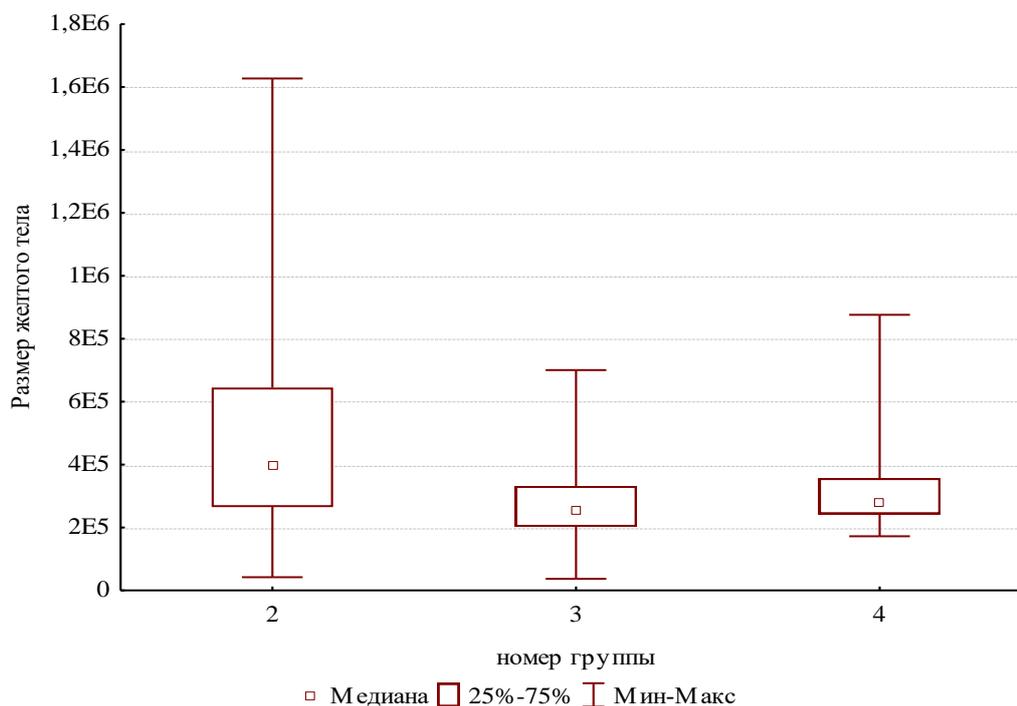


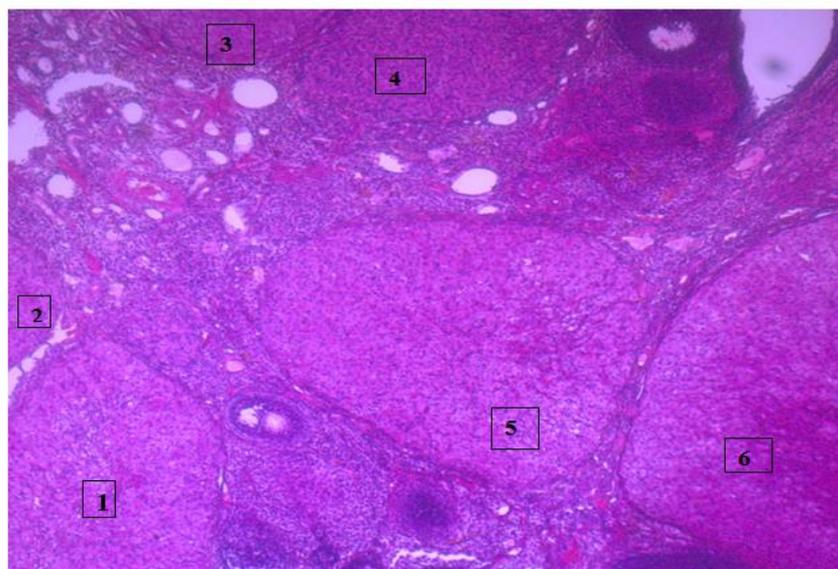
Рисунок 40 – Размеры желтого тела групп 2-й, 3-й и 4-ой

При световой микроскопии, так же отмечалась разница в количестве желтых тел, которые попадали в репрезентативный срез. Количественная характеристика желтых тел по группам представлена в таблице 28 и на рисунке 41.

Таблица 28 – Описательные статистические данные по количеству желтых тел в яичниках крыс и их потомства

Группа	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Lower	Upper	Range	Quartile	Std.Dev.	Standard
1 группа	10	8,400000	8,000000	6,000000	11,00000	7,000000	10,00000	5,000000	3,000000	1,837873	0,581187
2 группа	10	6,600000	6,000000	4,000000	10,00000	6,000000	7,000000	6,000000	1,000000	1,955050	0,618241
3 группа	12	5,166667	5,000000	3,000000	8,000000	4,000000	7,000000	5,000000	3,000000	1,696699	0,489795
4 группа	10	4,400000	4,500000	3,000000	5,000000	4,000000	5,000000	2,000000	1,000000	0,699206	0,221108

При проведении статистического межгруппового сравнения, мы выявили значимые различия между группами 1 и 2 ( $p=0,0224$ ), 1 и 3 ( $p=0,002$ ), 1 и 4 ( $p=0,0001$ ), 2 и 4 ( $p=0,0014$ ).



1-6- номера желтых тел

Рисунок 41 – Желтые тела в срезе яичника самок крыс контрольной группы. В одном поле зрения визуализируется 6 желтых тел. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: 10x40



1-4 – номера желтых тел

Рисунок 42 – Желтые тела в срезе яичника самок крыс опытной группы

На рисунке 42 представлен репрезентативный срез яичника опытных групп. Нами также был проведен сравнительный анализ желтых тел яичников разных экспериментальных групп животных по объему вакуолизованных лютеоцитов. Понятие цитоплазматической вакуолизации хорошо известно морфологам, и встречается в клетках млекопитающих после воздействия

различных патогенов, которые могут быть бактериальной, вирусной, химической природы. Вакуолизация часто сопровождается гибелью клеток. В настоящее время способность вызывать необратимую вакуолизацию описана для различных природных и синтетических соединений различной химической структуры, включая медицинские препараты и промышленные загрязнители [180, p. 149; 181, p. 1768; 182; 183; 184].

Изучено, что в большинстве случаев, цитоплазматические вакуоли образуются из компонентов эндоплазматического ретикулума или эндосомально - лизосомальной органеллы, это может зависеть от различных механизмов в зависимости от индуктора. Следовательно, можно рассматривать вакуолизацию как побочный эффект действия цитотоксических факторов. Результаты наших исследований представлены на рисунке 43.



1 – группа – контрольные животные; 2 – группа – затравленных животных

Рисунок 43 – Объем вакуолизированных лютеоцитов в желтых телах яичников животных 1-й и 2-й групп

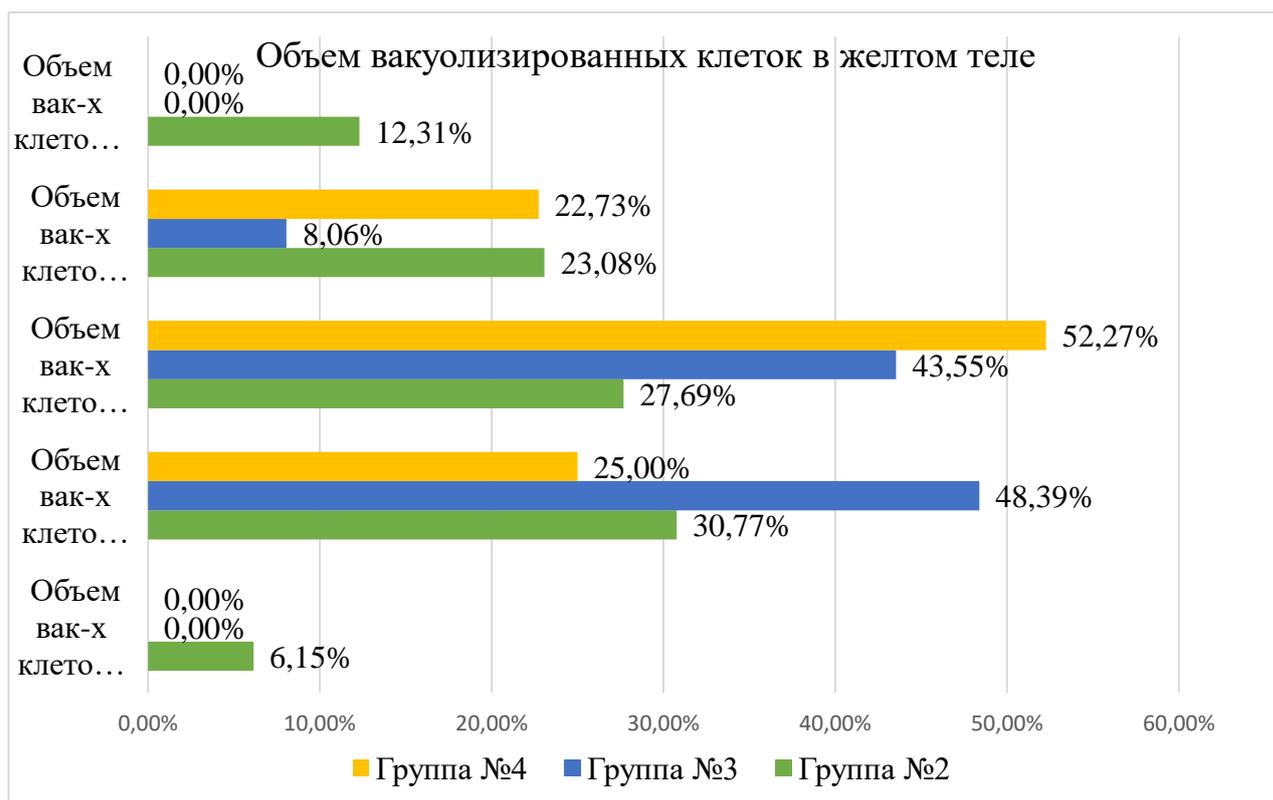
При статистическом сравнении объема вакуолизированных лютеоцитов в желтых телах 1-й и 2-й групп использовался критерий  $\chi^2$ . Данные представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Сравнение объема вакуолизированных клеток в первой и второй группах

Показатель	Chi-square	df	P
Pearson Chi-square	<b>66,68</b>	<b>df=4</b>	<b>p=0,000</b>
Phi	<b>0,671</b>		

1-я и 2-я группы статистически значимо отличаются по объему вакуолизации цитоплазмы ( $\chi^2=66,68$ ;  $p=0,000$ ).

При сравнительном статистическом анализе между поколениями получили следующие данные: группы 2 и 3 статистически значимо ( $\chi^2=20,74$ ;  $p=0,00036$ ) отличаются по объему вакуолизации цитоплазмы. 2-я и 4-я группы статистически значимо ( $\chi^2=12,65$ ;  $p=0,013$ ) отличаются по объему вакуолизации цитоплазмы. 3-я и 4-я группы статистически значимо ( $\chi^2=7,965$ ;  $p=0,019$ ) отличаются по объему вакуолизации цитоплазмы. Сравнение 2,3,4 групп по объему вакуолизации цитоплазмы представлено на рисунке 44.



2 – группа затравленных животных; 3 – группа затравленных животных (F1); 4 – группа затравленных животных (F2)

Рисунок 44 – Объем вакуолизованных клеток в лютеоцитах в опытных группах

На рисунке 44 видно, что в третьей группе чаще встречаются желтые тела с количеством вакуолизованных клеток 30 %, тогда как более чем в половине желтых тел в четвертой группе вакуолизация достигает 50%. Однако, наименьший и наибольший объем вакуолизованных клеток (менее 10% и более 81%) встречается в желтых телах второй группы и достигает 6,15% и 12,31% соответственно.

Мозговое вещество яичника занимало центральное положение в органе и по сравнению с корковым веществом имело меньший объем. В основном мозговое

вещество состояло из соединительной ткани, в которой хорошо определялись многочисленные кровеносные сосуды. Соединительнотканый матрикс органа был образован сравнительно небольшим количеством фибриллярных структур, пространство между которыми занимало основное аморфное вещество с мелкими клетками со слабобазофильной цитоплазмой. Кровеносные сосуды в большинстве случаев были запустевшими, изредка встречались сосуды с небольшим количеством крови в просвете. Стенка сосудов в основном была сохранена, интима без особенностей.

Мозговое вещество занимало большую площадь органа и находилось в центре. Основу составляла соединительная ткань богатая кровеносными сосудами и беспорядочно расположенными волокнистыми структурами. Кровеносные сосуды были более крупными чем в контрольной группе и чаще встречались полнокровными. Стенки сосудов были набухшими, местами определялось разволокнение отдельных ее участков, также отмечалось отслоение некоторых эндотелиоцитов от базальной мембраны. Соединительная ткань вблизи сосудов местами имела инфильтрацию мелкими базофильными клетками.

По результатам экспериментального исследования можно судить о том, что ингаляционная затравка мелкодисперсными пыле - солевыми аэрозолями со дна Аральского моря в дозе 0,15 мг/м<sup>3</sup> в течении 30 дней, влияют на этапы развития фолликулогенеза, происходит разнонаправленные морфофункциональные нарушения созревания качественного ооцита у самок крыс, что позволяет относить данный химический загрязнитель к классу репродуктивных экотоксикантов.

### **3.3 Цитогенетическая характеристика наследственного материала самок белых крыс и их потомства под воздействием пыле – солевых аэрозолей Аральского моря**

В литературе описаны неоднозначные эффекты воздействия отдельных тяжелых металлов в экспериментальных исследованиях на живой организм с проявлением различных мутагенных и генотоксических эффектов [185-187].

Геномная нестабильность в организме проявляется на клеточном, хромосомном и геномном уровне. Группа изменений числа хромосом характеризуется анеуплоидиями и полиплоидиями, которые формируются в следствии геномной нестабильности в организме. Данные нарушения приводят к развитию генетической патологий у плода, и по данным зарубежных авторов в 50% случаев являются причиной нарушения внутриутробного развития плода, остановке его развития плода на ранних этапах эмбриогенеза, и развития самопроизвольных абортов [188-191].

Из анализа литературных данных известно, что нерасхождение гомологичных хромосом приводят к нарушению кроссинговера и также являются причиной внутриутробной гибели эмбрионов и плодов [144, р. 55872; 192].

В настоящее время есть большое количество работ по изучению генотоксических эффектов тяжелых металлов в зависимости от пути попадания в организм, времени проведения эксперимента и дозы исследуемого вещества.

Для изучения генотоксического эффекта влияния пыли – солевых аэрозолей Аральского моря, как комплексного экологического фактора, мы исследовали цитогенетические изменения на хромосомном и клеточном уровне в костном мозге самок белых крыс и их потомства. Костный мозг относится к тканям с быстрым темпом пролиферации, поэтому именно его было решено взять для изучения.

Из анализа литературных данных, известно, что с целью научных исследований удобно использовать метод подсчета клеток с микроядрами. Микроядра образуются из фрагментов структурных нарушений хромосом. Микроядерный тест дает возможность оценить развитие соматической клетки под воздействием экологических факторов.

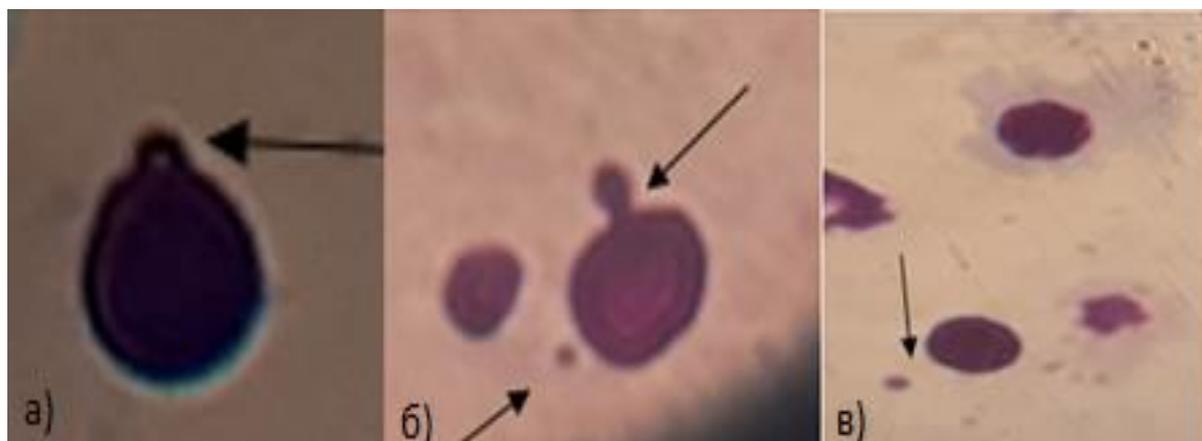
На клеточном уровне мы изучали количество полихроматофильных эритроцитов, содержащих микроядра. Микроядерный тест до настоящего времени остается надежным методом, дающим оценку токсичности окружающей среды. Микроядра возникают из кусочков хромосом, которые под действием каких-либо факторов при делении были повреждены. Эти фрагменты отсеиваются и не входят в ядро новой клетки. Таким образом, выделяются несколько видов микроядер: собственно, микроядра, а также различного вида протрузии, когда днк - содержащая часть ядра отделяется от основной части ядра перемычкой. Это так называемые протрузии типа «разбитое яйцо», «язык», «пузырек». Клетки считались микроядерными, когда они содержали частицы хроматина размером менее одной трети диаметра ядра и окрашивались одинаково с ядром, из которого образовалось микроядро.

Результаты наших исследований представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в мазках костного мозга самок крыс различных групп

Но-мер груп-пы	Кол-во жи-вотных	Общее кол-во изу-ченных клеток	Общее кол-во клеток с микроядрами на 1000 клеток (M±m)	Количе-ство клеток с МЯ	Количе-ство клеток с протрузией типа «язык»	Количе-ство клеток с протрузией типа «разбитое яйцо»	Количество клеток с протрузией типа «пузырек»
1	10	10000	2,0±0,25	1,0±0,00	1,6±0,4	1,0±0,00	1,0±0,00
2	10	10000	6,9±0,37	4,0±0,25	1,2±0,14	1,37±0,18	1,2±0,18
3	12	12000	8,8±0,16	4,2±0,37	1,6±0,26	1,5±0,16	1,5±0,22
4	10	10000	8,7±0,39	5,1±0,37	1,6±0,4	1,28±0,18	1,1±0,11
*— p < 0,05							

На рисунке 45 представлен препарат костного мозга животных опытных групп. Хорошо визуализируется полихроматофильный эритроцит с четкими контурами прокрашенного ядра.



а) – протрузия типа «пузырек»; б) – протрузия типа «разбитое яйцо» и микроядро; в) – микроядро

Рисунок 45 – Препараты костного мозга крыс опытных групп

При проведении статистического анализа, для сравнения статистической значимости различия средних значения количества клеток с микроядрами в каждой группе мы использовали метод Краскелла-Уоллиса, при  $p < 0,05$ . Результаты сравнения во всех 4-х группах представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Сравнение количества клеток с МЯ на 1000 клеток по методу Краскелла-Уоллиса

Code	Valid (n)	Sum of ranks
1	10	55,0000
2	10	233,0000
3	12	328,5000
4	10	286,5000
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(3, N=42) = 24,02437$ $p = 0,0000$		

Таким образом, из таблицы 31 видно, что все группы в целом значимо отличаются между собой по количеству клеток с микроядрами. Однако, для более точного ответа, мы провели анализ по группам.

Существуют статистически значимые различия в количестве клеток с микроядрами между 1 и 2 группой ( $p = 0,0001$ ), между 1 и 3 группой ( $p = 0,0001$ ), между 1 и 4 группой ( $p = 0,0001$ ), между 2 и 3 группой ( $p = 0,0002$ ), между 2 и 4 группой ( $p = 0,0027$ ).

Статистически значимые различия в количестве клеток с микроядрами на 1000 изученных клеток отсутствуют между 3 и 4 группами ( $p = 0,8771$ ).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что нестабильность генома на клеточном уровне развивается при ингаляционном воздействии пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря не только в группе затравки по сравнению с контрольной группой, но и в соматических клетках потомков затравленных родителей, которые остаются жить в тех же условиях.

Таким образом, микроядерный тест как индикатор мутагенного эффекта проявил себя повышением количества полихроматофильных эритроцитов в костном мозге у животных, подвергнутых воздействию химическими загрязнителями, входящими в состав пыли – солевых аэрозолей Аральского моря.

Результаты экспериментального исследования, полученные с помощью микроядерного теста, указывают на целесообразность проведения исследования на цитогенетическом уровне.

Перестройка хромосом делится на внутривхромосомные и межхромосомные. Первые включают в себя делеции, дупликации, инверсии, кольцевые хромосомы и изохромосомы. К межхромосомным относят транслокации и инсерции. Эти хромосомные аномалии могут передаваться от родителей или же возникать вновь при воздействии внешних факторов.

В комплексе хромосомных аберрация, значительную часть представляют перестройки хроматидного ряда, что говорит о химической природе мутагенного фактора в пыле- солевых аэрозолях Аральского моря.

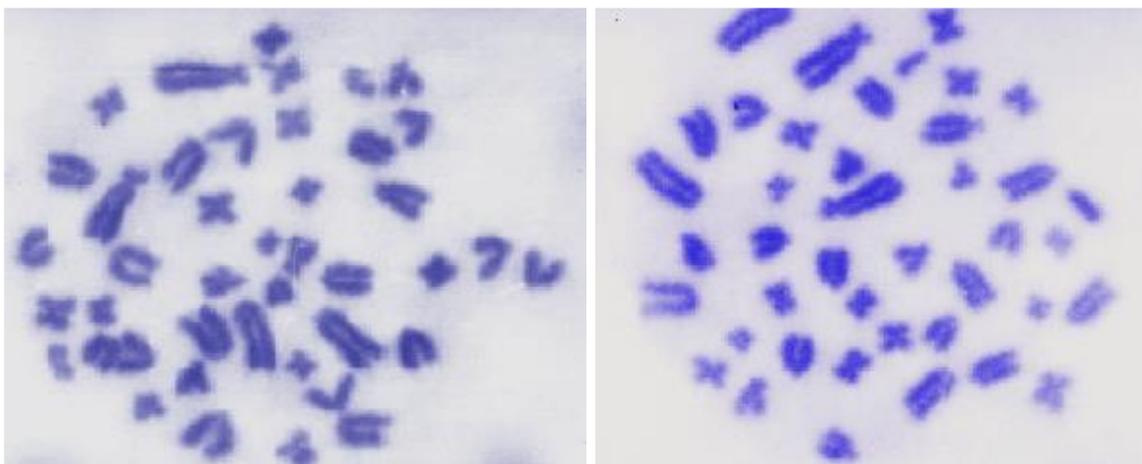
В таблице 32 представлены результаты цитогенетического исследования.

Таблица 32 – Анализ метафазных пластин костного мозга самок крыс

Номер группы и кол-во животных	Количество изученных метафаз	Число хромосомных аберраций на 100 метафаз		
		Всего аберраций	Хромосомного типа	Хроматидного типа
1 (n=10)	2000	1,7±0,67	0,3 ±0,15	1,4 ±0,16
2 (n=10)	2000	4,7±0,94	0,7 ±0,15	4,0 ±0,25
3 (n=12)	2400	5,6±0,88	0,58 ±0,22	5,08 ±0,19
4 (n=10)	2000	6,1±0,81	0,9 ±0,17	5,2 ±0,24

Проведя сравнительный статистический анализ полученных результатов непараметрическим методом Краскелла - Уоллеса, мы выяснили, что имеются статистически значимые различия между группами 1 и 2 ( $p=0,0001$ ), 1 и 3 ( $p=0,0001$ ), 1 и 4 группами ( $p=0,0001$ ), 2 и 3 ( $p=0,029$ ), 2 и 4 группами ( $p=0,0061$ ). Однако статистически значимого различия по общему количеству аберраций между группами 3 и 4 не выявлено ( $p=0,2817$ ).

На рисунке 46 представлены метафазные пластины в контрольной и опытных группах.



а

б

а – контрольной группы  $2n=42$ ; б – опытной группы  $2n=41$

Рисунок 46 – Метафазные пластинки

Суммируя все вышесказанное можно сделать заключение, что цитогенетические исследования костного мозга у экспериментальных животных показали, что во всех опытных группах наблюдается хромосомный дисбаланс. Цитогенетическое изучение хромосом у животных, подвергнутых воздействию химическими загрязнителями, дает возможность идентифицировать изменения на хромосомной и хроматидном уровнях. Наши результаты изучения хромосомных aberrации, дают возможность установить генетический риск воздействия пыле-солевых аэрозолей Аральского моря как экологического фактора, дестабилизирующего геном.

Возможно, дестабилизация генома, происходит из-за повышения маркеров окислительного стресса в клетке.

В связи с этим для подтверждения нашей гипотезы о нарушении фолликулогенеза и развития геномной нестабильности у самок крыс и их потомства при ингаляционной заправке пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря в течении 30 дней мы параллельно изучали состояния продуктов ПОЛ-АОЗ в крови и гомогенате яичников у этих животных.

### **3.4 Характеристика состояния продуктов окислительного стресса в крови и гомогенате яичников у самок крыс и их потомства при воздействии пыле-солевых аэрозолей Аральского моря**

Проведенный анализ зарубежных и отечественных исследователей, показали, что ингаляционная заправка пыле-солевыми аэрозолями ведет к развитию окислительного стресса и коррелирует с частотой возникновения патологии со стороны легочной системы [189, р. 26]. Окислительный стресс по сути - это нарушение равновесия между двумя физиологическими процессами, происходящими в любом живом организме, который дышит, питается, спит и т.д. Происходит дисбаланс между окислителями и антиоксидантной системой, и, как

результат образуются свободные радикалы, которые в свою очередь повреждают структуры клеточной мембраны, и мембраны органелл клетки и в запущенных случаях и ДНК клеток. Как следствие, так же страдают другие системы организма, о чем свидетельствуют наши клинические исследования [189, р. 26; 190, р. 29; 191, с.55; 192, с. ВМ068.15]. Однако, изучая репродуктивные органы, мы выяснили, что женские половые клетки имеют прочную систему защиты от внешних повреждающих факторов. Особенно это актуально для женских половых клеток, так как их резерв ограничен и с момента внутриутробного развития до наступления периода менопаузы, новых яйцеклеток в организме женской особи не образуется в отличие от мужской особи, где половые клетки с начала наступления полового созревания образуются с четкой периодичностью [193, 194].

Таким образом, перед нами возникла задача: определить происходят ли процессы развития окислительного стресса локально в органах женской половой системы и есть ли значимые различия между нарушением равновесия липоперекисного каскада.

Для достижения поставленных целей и задач, нами проводилось изучение продуктов окислительного стресса в гомогенате яичников и крови у самок крыс, и их потомства при воздействии пыле-солевых аэрозолей Аральского моря в течении 30 дней. Полученные биохимические результаты представлены в таблицах 33, 34.

В результате исследования уровня содержания МДА в гомогенате яичников у крыс так же достоверно увеличивается во всех опытных группах по сравнению с контрольной группой при воздействии пыле-солевых аэрозолей Аральского моря. Однако, статистически значимых различий между опытными группа не наблюдалось.

В таблице 39 представлены результаты по уровню ГПО и КАТ в крови и гомогенате яичников животных в исследуемых групп. При сопоставлении изменений активности ферментов в крови и гомогенате яичников самок крыс первой группы показало тенденцию к снижению активности каталазы и глутатионпероксидазы.

Однако, наиболее явное снижение активности ГПО в крови отмечается во 2-й группе – снижается на 20,43% по сравнению с 1-й группой, тогда как уровень ГПО в гомогенате яичников в опытных группах 2,3 и 4 находятся практически на одном уровне, и снизился по сравнению с 1-й группой на 26,46%, 26,69%, 26,4% соответственно.

Уровень каталазы в крови во всех опытных группах находится на одном уровне, и в среднем в 2,8 раза меньше, чем в 1-й группе. Отмечается снижение активности уровня каталазы в гомогенате яичников после ингаляционной заправки в опытных группах снизился на 55,8%, 56,9% и 57% во 2-й, 3-й и 4-й группах соответственно по сравнению с 1-й группой.

Таблица 33 – Уровень МДА в крови и гомогенате яичников половозрелых самок крыс при воздействии пыли- солевыми аэрозолями Аральского моря

Биологический материал	Группа 1	Группа 2		Группа 3		Группа 4	
	n =	n =		n =		n =	
	M+m (ДИ)	M+m (ДИ)	p-value	M+m (ДИ)	p-value	M+m (ДИ)	p-value
Кровь (мкмоль/мл)	0,738±0,06 (0,7-0,79)	1,79±0,154 (1,65-1,87)		2,09±0,16 (1,95-2,16)		2,05±0,156 (1,92-2,14)	
Гомогенат (мкмоль/г)	2,05±0,24 (1,9-2,25)	5,33±0,3 (5,18-5,61)		5,42±0,237 (5,23-5,53)		5,57±0,122 (5,45-5,63)	
Примечание – Достоверность по сравнению с контролем $p < 0,05$							

Существуют статистически значимые различия между 2 и 3 группой ( $p=0,001842$ ) и между 2 и 4 группой ( $0,009003$ ). Вместе с тем 3 и 4 группа статистически значимо не различаются по уровню МДА в крови животных ( $p=1,000$ )

Таблица 34 – Множественные сравнение 2, 3 и четвертой групп по уровню МДА в крови животных

Группы	2 - R:7,4500	3 - R:21,208	4 - R:19,900
2		0,001842	0,009003
3	0,001842		1,000000
4	0,009003	1,000000	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H ( 2, N= 32) =13,75717$ $p =,0010$			

При сравнении 1 и 2 групп по уровню МДА в крови и гомогенате яичников животных использовался критерий Манна-Уитни. Результаты статистического сравнения данных групп представлены в таблице 35 и 36.

Таблица 35 – Результаты сравнения уровня МДА в крови животных 1 и 2 групп

Показатель	Rank Sum - Group 1	Rank Sum - Group 2	U	Z	p-level	Z - adjusted	p-level	Valid N - Group 1	Valid N - Group 2	2*1sided exact p
Уровень МДА в крови	55,00000	155,0000	0,00	-3,77964	0,000157	-3,78107	0,000156	10	10	0,000011
Примечание – U-критерий Манна-Уитни, для $\alpha=0,05$										

Таблица 36 – Результаты сравнения уровня МДА в гомогенате животных 1 и 2 групп

Показатель	Rank Sum - Group 1	Rank Sum - Group 2	U	Z	p-level	Z - adjusted	p-level	Valid N - Group 1	Valid N - Group 2	2*1sided exact p
Уровень МДА в гомогенате	55,00000	155,0000	0,00	-3,77964	0,000157	-3,79250	0,000149	10	10	0,000011
Примечание – U-критерий Манна-Уитни, для $\alpha=0,05$										

Из таблиц 35 и 36 видно, что 1 и 2 исследуемые группы статистически значимо отличаются по уровню МДА в крови и в гомогенате ( $p=0,0001$ ). У 2 группы уровень МДА увеличивается.

Таблица 37 – Множественные сравнения 2, 3 и четвертой групп по уровню МДА в гомогенате яичников животных

Группы	2 - R:14,750	3 - R:14,375	4 - R:20,800
2		1,000000	0,447812
3	1,000000		0,329063
4	0,447812	0,329063	
Примечание – Kruskal-Wallis test: $H(2, N=32) = 3,088691$ $p = 0,2135$			

Таблица 38 – Уровень каталазы и ГПО в крови и гомогенате яичников половозрелых самок крыс при воздействии пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря

Показатель	Биологический материал	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
		M+m (ДИ)	M+m (ДИ)	M+m (ДИ)	M+m (ДИ)
ГПО	Кровь (мкмоль/мин/мл)	0,93±0,056 (0,87-0,95)	0,74±0,07 (0,697-0,79)	0,81±0,02 (0,79-0,82)	0,82±0,016 (0,81-0,84)
	Гомогенат (мкмоль/мин/г)	87,3±0,92 (86,7-88,05)	64,2±0,58 (63,8-64,67)	4,0±0,48 (63,8-64,42)	64,25±0,324 (63,97-64,44)
КАТ	нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/мл	0,53±0,04 (0,5-0,56)	0,2±0,02 (0,19-0,22)	0,18±0,009 (0,17-0,184)	0,18±0,13 (0,17-0,19)
	нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/г	0,62±0,02 (0,61-0,64)	0,274±0,007 (0,268-0,279)	0,273±0,009 (0,267-0,279)	0,266±0,01 (0,26-0,28)
Примечание – Достоверность по сравнению с контролем $p < 0,05$					

Как видно из полученных результатов после ингаляционной заправки пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря, активность ферментов в крови и гомогенате яичников у крыс носит разнонаправленный характер.

Следовательно, совокупность полученных нами данных показывает, что ингаляционное воздействие пыле-солевых аэрозолей Аральского моря на организм половозрелых самок крыс в течении 30-ти дней индуцирует развитие каскада сложных метаболических нарушений, о чем свидетельствует нарушение процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты.

Учитывая, что каталаза - это фермент первой линии антиоксидантной защиты, тогда как глутатионпероксидаза – это показатели второй линии антиоксидантной защиты, то целесообразным стало посчитать коэффициент соотношения КАТ и ГПО. Данные наших исследований по соотношению этих показателей АОЗ представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Коэффициент соотношения Кат/ГПО в крови и гомогенате яичников у крыс

Показатель	1 Группа М+m	2 Группа М+m	3 Группа М+m	4 Группа М+m
Кат/ГПО в крови	0,57	0,27	0,22	0,22
Кат/ГПО в гомогенате	0,007	0,004	0,004	0,004
*– $p < 0,05$				

Как следует из полученных результатов, после ингаляционной заправки пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря, в опытных группах 2-й, 3-й и 4-й происходит снижение коэффициента КАТ/ГПО по сравнению с 1-й группой. Это свидетельствует снижении активности КАТ при менее значимом изменении активности ГПО как в крови так и в гомогенате яичников.

При оценке полученных результатов мы выяснили, что химические загрязнители, входящие в состав пыле-солевых аэрозолей Аральского моря при ингаляционной заправке крыс в течение 30 дней приводят к глубоким изменениям продуктов липоперекисного каскада. Более значимые отклонения от показателей контрольной группы отмечалось при изучении вторичных продуктов липоперекисного каскада в крови и гомогенате яичников. В противовес окислительным процессам, в организме животных наблюдалось снижение активности ферментов антиоксидантной защиты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая длительность развития масштабной экологической проблемы Аральского моря, воздействию экологического фактора в данном регионе подвергаются не одно поколение. Антропогенное загрязнение отходами тяжелой промышленности, сточными водами сельскохозяйственной промышленности в реки, впадающие в Аральское море, дали основу накоплению вредных химических веществ на дне водного источника [11, с. 33; 34, с. 3; 35, с. 127]

Нерациональное использование водных ресурсов повлекло за собой уменьшение водных границ и оголение участков дна с уже накопленными в нем тяжелыми металлами и пестицидами [9, с. 28-30; 10, р. 29-30; 32, с. 32; 33, с. 29, 32].

Комплекс вредных химических веществ вперемешку с морской солью разносится ветром на тысячи километров от водоема, и тем самым оказывает пагубное воздействие на растительность, животный мир и на здоровье человека [33, с. 29].

Однако, значительнее всего от данного экологического кризиса страдает население, проживающее в данном регионе и граничащих с ним областях. Особенно настораживает то обстоятельство, что организм человека способен накапливать негативные последствия влияния на свой организм и передавать информацию своим потомкам [5, р. 21; 100, р. 157; 193, р. 252].

На основании литературного обзора нами установлено, что химические загрязнители, входящие в состав пыли - солевых аэрозолей Аральского моря вызывают глубокие отклонения на патоморфологическом уровне на бронхолегочную, пищеварительную, сердечно-сосудистую системы организма [61, р. 2; 62, р. 120; 63, с. 18; 64, с. 6; 65, с. 364; 66, р. 1064].

По литературным данным, нами установлено, что влияние пыли- солевых аэрозолей Аральского региона на репродуктивную функцию не полностью освещается, не затрагиваются вопросы морфологических изменений ткани яичников и цитогенетических изменений в поколении.

В связи с этим, было актуально проведение экспериментального исследования воздействия химических загрязнителей, входящих в пыли- солевых аэрозолей Аральского моря на организм в поколениях.

Объектом нашего исследования были самки белых лабораторных беспородных крыс и их потомки женского пола, которые подвергались ингаляционному воздействию пыли- соевыми аэрозолями в течении 30 дней.

Цели и задачи, поставленные в диссертационной работе, были выполнены полностью.

Впервые методом атомно- абсорбционной спектрометрии установлено накопление солей тяжелых металлов, содержащиеся в пыли- солевых аэрозолях Аральского моря в тканях яичников самок белых крыс при ингаляционном воздействии в течение 30 суток.

Получены новые результаты, указывающие на нарушение процессов фолликулогенеза у самок белых крыс и их потомства. Прослеживается

тенденция в снижении соотношении площади коркового вещества к площади мозгового вещества по группам. Этот факт значителен, так как именно в корковом веществе яичника имеются делящиеся клетки, будущие половые клетки, а в мозговом веществе находится строма яичника [194, p. 372; 195; 196]. И если основная функциональная часть, гормон синтезирующая часть яичника уменьшается в размерах, то происходит развитие гормональной недостаточности особи.

В ходе экспериментального исследования нами установлены значительные изменения показателей морфологических и морфометрических исследований ткани яичников самок крыс. Об этом свидетельствует статистически значимые глубокие отклонения морфометрических показателей фолликулогенеза: снижение количества первичных фолликулов, желтых тел и большое количество атретичных фолликулов по сравнению с контрольной группой. Данные согласуются с проведенными ранее работами по изучению влияния интоксикации некоторыми тяжелыми металлами на морфологическую структуру яичников крыс и преждевременного истощения яичников в результате образования большого количества атретичных фолликулов [5, p. 21; 98, p. 87; 99, p. 343].

Также, нами зафиксированы качественные изменения в тканях яичников опытных групп, которые могут приводить к эндокринным нарушениям (повышение вакуолизации цитоплазмы фолликулов и лютеоцитов, нарушение целостности *zona pellucida*).

Происходящая вакуолизация фолликулярной жидкости и вакуолизации лютеоцитов, разрывы между клетками гранулезы, говорят нам о развитии гормональной недостаточности, гиперэстрогемии и гипопрогестеронемии [158, p. 598; 196, с. 32; 198].

Так, в работе Jiarui Sun с соавторами в 2016 году показал, что при воздействии на половозрелых самок крыс смесью меламина и циануровой кислоты происходят морфологические изменения ткани яичников, которые проявляются гибелью ооцитов, истончением гранулезы и значительным увеличением атретических фолликулов по сравнению с группой контроля [199].

Мы считаем, что данные результаты могут свидетельствовать в пользу эндокринных нарушений, вызванных ингаляционным воздействием пыли – солевыми аэрозолями Аральского моря. Это необходимо проверить при дальнейшем изучении данного экологического фактора.

Ингаляционное воздействие пыли-солевыми аэрозолями на самок белых лабораторных крыс и их потомство показало, что в ткани яичника происходит истончение нерегулярной *zona pellucida*, которая играет роль защитника ооцита [155, p. 230; 156, p. 646; 157, p. 1582; 158, p. 561].

Таким образом уже на данном этапе можно говорить о возможном повышенном риске для развития ооцита и будущего качественного оплодотворения у животных, подвергнутых затравкой пыли- солевыми аэрозолями Аральского моря.

В процессе проведения анализа статистической обработки результатов по количеству вторичных и третичных фолликулов, установлено, что стадийность созревания фолликулов у животных, которые впервые были затравлены пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря, не нарушена.

Однако, имеется статистически значимая тенденция к снижению созревающих фолликулов при ингаляционной затравке следующих поколений.

Мы определили, что ультраструктурные изменения яичников опытной группы исследования характеризовались патологией всех структур коркового вещества органа. На фоне деструкции, некроза кровеносных сосудов и фиброзирования стромы, фолликулярный эпителий первичных фолликулов подвергался дистрофическим изменениям в форме дестабилизации мембран лизосом. Деструкция ядра и всех отделов цитоплазмы в форме разрывов свидетельствовала об атрезии фолликулов.

Тяжелой деструкцией характеризовались и клетки theca interna, имеющие отношение к выработке эстрогена. Выраженные ультраструктурные изменения были отмечены в лютеиновых клетках стромы, являющиеся интерстициальной железой яичника. Накопление лютеинового пигмента, утилизация липидных включений и полное разрушение клеток отражало патологию выработки эстрогена, важного фактора постовуляторной фазы овариального цикла [200-202].

Таким образом мы выявили, что исходная опытная группа под воздействием пыле-солевых аэрозолей Аральского моря характеризуется тяжелыми качественными и количественными изменениями фолликулярного запаса.

Так же обнаружено что в поколениях обнаружены аналогичные структурные изменения яичников.

Тяжесть структурных изменений яичников в поколении статистически значимо выше в сравнении с исходной опытной группой.

Данные эксперимента показывают, что при воздействии пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря в тканях происходит повышенный расход восстановленного глутатиона на дотацию водорода и восстановления гидропероксидов липидов.

В результате снижается активность ГПО, КАТ и повышается МДА, что говорит об окислении ткани.

Именно эту тенденцию мы отметили в тканях яичников у опытных животных. Для подтверждения данной гипотезы, мы провели корреляционный анализ.

Как видно из проведенного корреляционного анализа, прослеживается высокая достоверная связь между показателями окислительного метаболизма и ферментами антиоксидантной защиты с показателями морфометрических исследований (таблица 40).

Таблица 40 – Корреляционный анализ взаимосвязи окислительного стресса, показателей фолликулогенеза и геномной нестабильности

Показатели	Количество желтых тел	Количество атретичных фолликул	Количество первичных фолликул	Количество примордиальных фолликул	Количество первичных фолликул с микроядрами	Количество клеток с микроядрами и протрузиями на 1000 клеток в костном мозге	Количество хромосомных aberrаций на 100 метафазных пластинок в костном мозге
МДА в крови	-0,6	0,71	-0,78	-0,48	0,03	0,93	0,87
МДА в гомогенате	-0,59	0,76	-0,71	-0,4	0,17	-	-
ГПО в крови	0,37	-0,56	0,39	0,14	-0,14	-0,55	-0,53
ГПО в гомогенате	0,59	-0,77	0,71	0,42	-0,15	-	-
КАТ в крови	0,6	-0,75	0,72	0,43	-0,12	-0,93	-0,87
КАТ в гомогенате	0,59	-0,76	0,71	0,42	-0,17	-	-
<p>* – <math>p &lt; 0,05</math>; <math>0,95 \leq  r  &lt; 1</math> – связь очень сильная, практически функциональная; <math>0,75 \leq  r  &lt; 0,95</math> – связь тесная (сильная); <math>0,5 \leq  r  &lt; 0,75</math> – связь средняя (умеренная); <math>0,2 \leq  r  &lt; 0,5</math> – связь слабая; <math>0 \leq  r  &lt; 0,2</math> – практически нет связи</p>							

Результаты исследования позволяют нам предполагать, что механизм нарушения фолликулогенеза обусловлен рядом факторов.

1 Накоплением солей тяжелых металлов в тканях яичников, а затем воздействием молекул тяжелых металлов на механизмы межклеточных контактов.

2 Развитие окислительного стресса в организме животных при ингаляционном воздействии пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря, и распространении свободных радикалов кислорода гематогенным путем, проникновением их через гемато-овариальный барьер и нарушая функции клеток.

Попадая в организм химические загрязнители, входящие в состав пыле – солевых аэрозолей вызывают в крови образование свободных радикалов, которые, в свою очередь, запускают каскад биохимических реакций. С целью стабилизировать данный процесс, в организме активизируется система АОЗ, ферменты которой в большом количестве содержатся в митохондриях клеток. При длительном ингаляционном воздействии данных химических загрязнителей происходит накопление вторичных продуктов ПОЛ. Этот факт находит свое подтверждение в ряде экспериментальных работ по изучению хронического воздействия токсикантами на различные системы [203-205]. Данные продукты оказывают разрушающее действие на клеточные структуры всего организма, в том числе и клеток репродуктивной системы. Окислительный стресс влияет на ДНК, белки и липиды мембран, тем самым гипоксию клеток, митохондриальную дисфункцию, нарушение теломеразной активности хромосом клеток [6, р. 234]. Происходит накопление недоокисленных веществ в клетке, нарушается энергетический обмен, энергообразование идет за счет гликолиза и развивается ацидоз, в следствии чего развивается ускоренный апоптоз и гибель клетки [204, с. 211; 205, с. 109; 206]. Мы полагаем, что вторым, параллельно протекающим процессом является накопление тяжелых металлов, входящих в пыле-солевые аэрозоли Аральского моря, в тканях яичника. Ионы этих металлов попадают в цитоплазму клеток посредством пиноцитоза или образуя комплексы с белками на мембране клетки. Проникая в цитоплазму клетки, они захватываются лизосомами, которые образуют вакуоли. Увеличиваясь в размерах, данные вакуоли вытесняют гормон продуцирующие компоненты клеток фолликуло и лютеоцитов в яичниках [207-209].

Таким образом развивается эстрогеновая и гестагеновая недостаточность. Часть лизосом перерастаясь, разрушается и повреждает рядом находящиеся структуры клеток, в том числе и митохондрии. В результате нарушается процесс деления клеток, развивается апоптоз. В результате двух параллельно протекающих процессов, происходит развитие геномной нестабильности и нарушение фолликулогенеза у самок крыс. Предполагаемая нами схема развития представлена на рисунке 47.

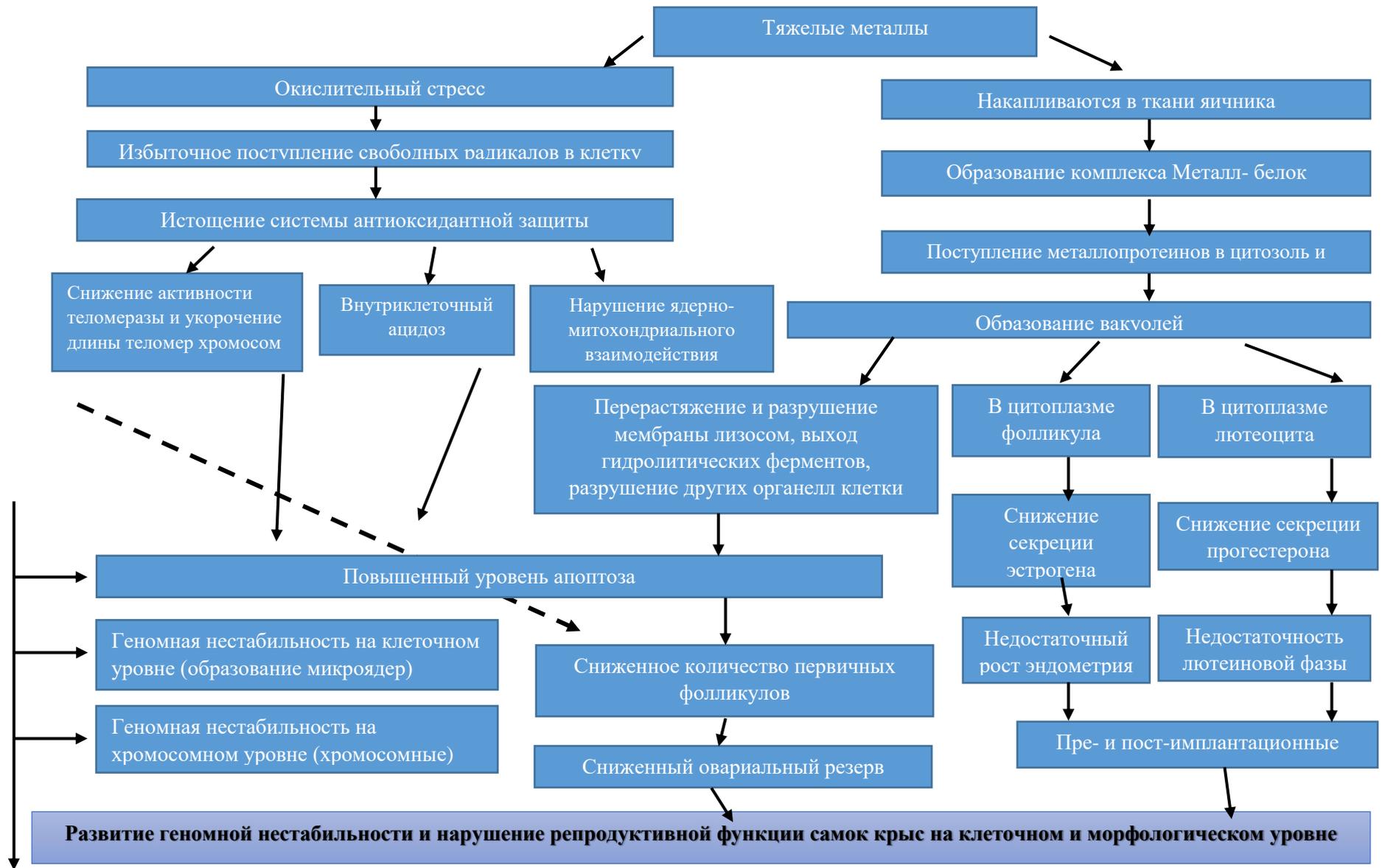


Рисунок 47 – Схема развития геномной нестабильности и нарушения репродуктивной функции самок крыс

Представленные в ходе исследования результаты позволяют расширить научные взгляды на нарушение процессов фолликулогенеза при воздействии на организм химических загрязнителей, входящих в состав пыли - солевых аэрозолей Аральского моря. Результаты эксперимента показывают целесообразность изучения влияния данного экологического фактора на репродуктивное здоровье женского организма и внедрение полученных результатов в практику для повышения навыков врачей морфологов и расширить знания по научно - исследовательскому направлению магистрантов разного профиля.

Ингаляционная затравка пыле - солевыми аэрозолями Аральского моря в течение 30 дней, приводит к увеличению МДА в крови и гомогенате яичников во всех опытных группах. И, как следствие, происходит снижение активности ферментов антиоксидантной защиты в исследуемых группах (каталаза в крови в 2,5 раза во 2-й группе, в 3 раза и 2,9 раза в 3-й и 4-й группе соответственно; каталаза в гомогенате в 2,3 раза;  $p < 0,005$ ).

Как видно из проведенного корреляционного анализа, прослеживается высокая достоверная связь между показателями окислительного метаболизма и ферментами антиоксидантной защиты с показателями морфометрических исследований.

Результаты исследования позволяют констатировать, что под ингаляционным воздействием пыли - солевых аэрозолей Аральского моря, развивающийся окислительный стресс влияет также на нестабильность генома у опытных животных.

Выявлено повышение хромосомных aberrаций в метафазных пластинках костного мозга (в 2,7, в 3,2 и 3,5 раза исходной опытной группе, первом и втором поколении опытной группы соответственно по сравнению с группой контроля, при  $p < 0,05$ ). Нарушения представлены образованием кольцевых хромосом, а также изменением количества хромосом в мазках костного мозга животных опытных групп.

Установлено, что под ингаляционным воздействием химическими загрязнителями, входящими в состав пыли- солевых аэрозолей Аральского моря, происходит увеличение количества клеток в костном мозге с микроядрами и разного вида протрузиями.

Мы считаем, что пусковым механизмом хромосомных aberrаций являются изменения самого микроядра, нарушение репликации ДНК в соматической клетке. Если клетка продолжит деление, то микроядро может объединиться с основным хромосомным набором клетки и в таком случае образуется клетка с полиплоидным набором, или наоборот отделиться и тогда образуется набор с недостающим числом хромосом, что может привести в дальнейшем к различным патологическим процессам.

На основании результатов экспериментального исследования можно сделать *следующие выводы*:

1) установлено накопление солей тяжелых металлов, относящихся к классу репродуктивных токсикантов, в тканях яичников крыс при ингаляционном

воздействии пыле- соевыми аэрозолями Аральского моря, которые приводят к изменениям на клеточном, тканевом и органном уровне;

2) в результате ингаляционного воздействия пыле – соевыми аэрозолями Аральского моря на фолликулогенез у самок белых крыс и их потомства отмечается статистически значимые качественные и количественные изменения коркового и мозгового слоев яичника опытных групп в сравнении с группой контроля.

Выявлено уменьшение площади коркового слоя и фолликулярного запаса яичников в первом и втором поколениях опытной группы в сравнении с группой контроля и исходной опытной группой ( $p < 0,05$ ).

Структурные качественные изменения яичников от крыс опытных групп ассоциировались с дистрофическими изменениями тяжелой степени, характеризующиеся вакуолизацией цитоплазмы, некробиотическими изменениями структурно- функциональных клеток желтых тел и фолликулов в сравнении с контрольной группой. Более тяжелые изменения выявляются у последующих поколений в сравнении с исходной группой.

Установлена обратная тесная и обратная средняя корреляционная зависимость между повышением уровня МДА в крови и в гомогенате соответственно и количеством первичных фолликулов в яичниках экспериментальных животных ( $r = -0,78$ ,  $r = -0,71$  при  $p < 0,05$ );

3) при изучении влияния химических загрязнителей, входящих в состав пыле - соевых аэрозолей Аральского моря, на наследственный материал у самок белых крыс и их потомства, выявлено увеличение количества гиперхроматофильных эритроцитов в мазках костного мозга у исходных животных опытной группы в 3,5 раза по сравнению с группой контроля ( $6,9 \pm 0,4$  и  $2,0 \pm 0,2$  при  $p < 0,05$ ). В поколениях происходит нарастание количества клеток с микроядрами в первом поколении животных опытной группы по сравнению с исходной группой на 22% ( $8,8 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ).

Наблюдается рост хромосомных aberrаций у исходных животных опытной группы в 2,8 раза по сравнению с группой контроля ( $4,7 \pm 0,9$  и  $1,7 \pm 0,7$  соответственно при  $p < 0,05$ ). Рост обусловлен aberrациями хроматидного типа. Количество хромосомных aberrаций у животных первого поколения увеличивается на 16%, а у животных второго поколения на 23%, в сравнении с животными исходной группы ( $5,6 \pm 0,9$  и  $6,1 \pm 0,8$ ;  $p < 0,05$ ).

Данные показатели имеют сильную корреляционную взаимосвязь с уровнем МДА в крови животных ( $r = 0,93$  для количества клеток с микроядрами и протрузиями, и  $r = 0,87$  для количества хромосомных aberrаций, при  $p < 0,05$ );

4) уровень малонового диальдегида в крови исходных животных опытной группы в 2,4 раза больше, чем в группе контроля ( $1,79 \pm 0,15$  и  $0,7 \pm 0,06$   $p < 0,05$ ). В поколениях в этот показатель возрастает на 14% в первом и 13% во втором поколении по сравнению с исходными животными опытной группы. Уровень малонового диальдегида в гомогенате яичников у исходных животных опытной группы превысил значения контроля в 2,6 раза ( $5,3 \pm 0,3$  и  $2,05 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ).

Активность каталазы уменьшился в крови исходных животных по сравнению с контрольной группой в 2,5 раза, в группах первого и второго поколения в 3 раза. В гомогенате исходной группы животных активность каталазы в 2,3 раза меньше, чем в контрольной группе.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Martenies S.E., Wilkins D., Batterman S.A. Health impact metrics for air pollution management strategies // *Environment international*. – 2015. – Vol. 85. – P. 84-85.
- 2 Sturla S. Systems Toxicology: From Basic Research to Risk Assessment *Chemical research in toxicology*. – 2014. – Vol. 17, № 27 (3). – P. 314-329.
- 3 Мустафина М.Д. Оценка репродуктивного здоровья женщин в Казахстане // *Вестник КазНМУ*. – 2013. – № 4 (1). – С. 271-274.
- 4 Комплексные подходы в управлении состоянием здоровья населения Приаралья: отчет о НИР (заключительный) / Научный центр гигиены труда и профессиональных заболеваний: рук. Сакиев К; исполн.: Ибраева Л.К., Мухаметжанова З.Т. – 2014-2016. – № ГР 0114РК00320.
- 5 Pauline Vabre, Nicolas Gatimel et al. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data // *Environmental Health*. – 2017. – № 1. – P. 18-26.
- 6 Buck Louis G.M, Sundaram R., Schisterman E.F. Persistent environmental pollutants and couple fecundity: the LIFE study // *Environmental Health Perspect.* – 2013. – № 121. – P. 231-236.
- 7 Gascon M., Vrijheid M., Nieuwenhuijsen M.J. The built environment and child health: an overview of current evidence // *Environmental Health Reproductive*. – 2016. – № 3 (3). – P. 250-257.
- 8 Jarvis G.E. Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say // *F1000Res*. – 2016. – № 5. – 2765 p.
- 9 Галаева О.С., Идрисова В.П. Климатические особенности пыльных бурь Приаралья // *Гидрометеорология и экология*. – 2007. – № 2. – С. 27-40.
- 10 Park Ae Kyung, Hong Yun Chul, Kim Ho. Effect of changes in season and temperature on mortality associated with air pollution in Seoul // *J. Epidemiol and Community Health*. – 2011. – № 4 (65). – P. 28-34.
- 11 Подзноева З.Л. Влияние техногенных и природных факторов на организм человека // *Экология промышленного производства*. – 2010. – № 5. – С. 31-35.
- 12 Jose Wilches-Gutierrez and Patricia Documet What is known about sexual and reproductive health in Latin American and Caribbean mining contexts? A systematic scoping review // *Public Health Reviews*. – 2018. – Vol. 39. – P. 1.
- 13 Мамырбаев А.А., Бекмухамбетов Е.Ж., Засорин Б.В., Кибатаев К.М. Содержание металлов в волосах и крови детского населения городов Актюбинской области // *Гигиена и санитария*. – 2012. – № 3. – С. 61-62.
- 14 Култанова Б.Ж. Нарушение сперматогенеза при воздействии некоторых физических и химических факторов и его коррекция: автореф. ... канд. биол. наук: 14.00.07. – Алматы, 2006. – 42 с.
- 15 Саяпина И.Ю., Огородникова Т.Л. Окислительный стресс в семенниках крыс, индуцированный адаптацией к низким температурам, и его коррекция дигидрокверцетином // *Научный журнал КубГАУ*. – 2013. – № 89 (05). – С. 39-42.

- 16 Турдыбекова Я.Г., Копобаева И.Л., Култанов Б.Ж., Слободичикова Т.С. Women's Reproductive Health in the Areas Bordering the Aral Sea Region // *Biology and Medicine, International Open Access Journal*. – 2015. – Vol. 7. – P. 2-4.
- 17 Турдыбекова Я.Г., Досмагамбетова Р.С., Копобаева И.Л., Култанов Б.Ж. The Health Status of the Reproductive System in Women Living in the Aral Sea Region // *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. – 2015. – Vol. 3. – P. 474-477.
- 18 Саммит глав государств-учредителей Международного фонда спасения Арала прошел в Туркменистане // [www.cis.minsk.by](http://www.cis.minsk.by). 24.08.2018.
- 19 Goudie A.S., Middleton N.J. Desert dust in the global system. – Springer, 2006. – P. 146.
- 20 Abuduwaili J., Liu D., Wu G. Saline dust storms and their ecological impacts in arid regions // *J. Arid Land*. – 2010. – № 2 (2). – P. 144-150.
- 21 Hoseinpour M., Fakheri Fard A., Naghili R. Death Of Urmia Lake, a Silent Disaster Investigating Causes, Results and Solutions of Urmia Lake drying // *1st International Applied Geological Congress, Department of Geology*. – Mashad: Islamic Azad University, 2010. – P. 700-704.
- 22 Eimanifar A., Mohebbi F. Urmia Lake (northwest Iran): a brief review // *Saline Systems*. – 2007. – № 3 (5). – P. 1-8.
- 23 Michael M. Goodman, Gregory T. Carling, Diego P. Fernandez, Kevin A. Rey, Colin A. Hale, Barry R. Bickmore, Stephen T. Nelson, Jeffrey S. Munroe. Trace element chemistry of atmospheric deposition along the Wasatch Front (Utah, USA) reflects regional playa dust and local urban aerosols // *Chemical Geology*. – 2019. – № 530. – P. 119317.
- 24 Liu D., Abuduwaili J., Lei J., Wu G. Deposition rate and chemical composition of the Aeolian dust from a bare saline playa, Ebinur Lake, Xinjiang, China // *Water Air Soil Pollut.* – 2011. – № 218 (1-4). – P. 175-84.
- 25 Mu G., Yan S., Jilil A., He Q., Xai X. Wind erosion at the dry-up bottom of Aiby Lake // *Sci China Ser D Earth Sci.* – 2002. – № 45 (1). – P. 157-164.
- 26 Cheng M-T., Chou W-C., Chio C-P., Hsu S-C., Su Y-R., Kuo P-H. Compositions and source apportionments of atmospheric aerosol during Asian dust storm and local pollution in central Taiwan // *J Atmos Chem.* – 2008. – № 61 (2). – P. 155-173.
- 27 Yu H., Chin M., Yuan T., Bian H., Remer L.A., Prospero J.M., Omar A., Winker D., Yang Y., Zhang Y., Zhang Z., Zhao C. The fertilizing role of African dust in the Amazon rainforest: A first multiyear assessment based on data from Cloud–Aerosol Lidar and Infrared Pathfinder Satellite Observations // *Geophysical Research Letters*. – 2015. – Vol. 42. – P. 1984-1991.
- 28 Derbyshire E. Natural minerogenic dust and human health // *AMBIO: Journal of the Human Environment*. – 2007. – Vol. 36. – P. 73-77.
- 29 García-Pando C.P., Stanton M.C., Diggle P.J., Trzaska S., Miller R.L., Perlwitz J.P., Baldasano J.M., Cuevas E., Ceccato P., Yaka P., Thomson M.C. Soil dust aerosols and wind as predictors of seasonal meningitis incidence in Niger // *Environmental Health Perspectives*. – 2014. – № 122 (7). – P. 679-686.

- 30 Han Y., Dai X., Fang X., Chen Y., Kang F. Dust aerosols: a possible accelerant for an increasingly arid climate in North China // *Journal of Arid Environments*. – 2008. – № 72 (8). – P. 1476-1489.
- 31 Twohy C.H., Kreidenweis S.M., Eidhammer T., Browell E.V., Heymsfield A.J., Bansmer A.R., Anderson B.E., Chen G., Ismail S., DeMott P.J. Van den Heever S.C. Saharan dust particles nucleate droplets in eastern Atlantic clouds // *Geophysical Research Letters*. – 2009. – № 36. – L. 01807. – P. 8833-8851.
- 32 Экологические проблемы Центральной Азии. – Ташкент: Экологическое движение Узбекистана, 2010. – 48 с.
- 33 Кулманов М.Е., Амрин К.Р., Кенесариев У.И. Гигиенические и экологические проблемы гидросферы и здоровья населения в зоне казахстанской части Приаралья // *Здравоохранение Казахстана*. – 1993. – С. 26-37.
- 34 Онищенко Г.Г. Основы оценки риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду // *Гигиена и санитария*. – 2007. – № 5. – С. 3-4.
- 35 Омарова Т.А., Казангапова Н.Б. Уровень пестицидного загрязнения реки Сырдарья и малого моря // *Медицинские, социальные и экологические проблемы Приаралья*. – Алматы, 1992. – С. 126-128.
- 36 Андрусихина И.Н. Сравнительная оценка спектральных методов определения макро – и микроэлементов в биосредах человека // *Актуальные проблемы транспортной медицины*. – 2009. – № 4 (18). – С. 75-83.
- 37 Колесникова Л.И. Окислительный стресс как неспецифическое звено репродуктивных нарушений Бюллетень СО РАМН. – М., 2012. – С. 58-66.
- 38 Кутяков В.А. Комплексный подход к оценке воздействия соединений свинца и цинка при судебно-химических исследованиях: автореф. ... канд. мед. наук. – Красноярск, 2016. – 96 с.
- 39 Бейзель Н.Ф. Атомно-абсорбционная спектрометрия: учебное пособие. – Новосибирск: 2008. – 72 с.
- 40 Забокрицкий М.П. Критерии выбора спектрального метода применительно к анализу микроэлементов в биологических объектах // *Микроэлементы в медицине*. – 2014. – № 15 (4). – С. 29-38.
- 41 Газизова А.О. Влияние соле-пылевого аэрозоля Аральского моря на органы дыхания (экспериментальное исследование): дис. ... док. фил. PhD: 6D110100. – Караганда, 2018. – 108 с.
- 42 Татина Е.С., Есильбаева Б.Т., Кислицкая В.Н., Ибраева Л.К., Култанов Б.Ж., Досмагамбетова Р.С. Актуальность исследования состояния здоровья населения Приаралья в современных условиях // *Журнал Успехи современного естествознания* – 2014. – № 9. – Ч. 2. – С. 167-169.
- 43 Turdybekova Ya., Kopybaeva I., Kultanov V.Zh. Perinatal outcomes in women living in the Aral Sea environmental disaster region // IX International symposium “Environmental and engineering aspects for sustainable living”. – 2014. – Hanover: EURO ECO, 2014. – P. 187.

- 44 Касымова Г.П., Жакупова М.Б. Медико-социальные аспекты репродуктивного здоровья женщин фертильного возраста // Медицина. – 2013. – № 9. – С. 23-25.
- 45 Турдыбекова Я.Г., Копобаева И.Л., Култанов Б.Ж. Comparative Assessment of Women's reproductive health in the Areas Bordering with Aral Sea Region // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2017. – № 7. – P. 269-275.
- 46 Марченко Л.А., Габибуллаева З.Г., Табеева Г.И., Бутарева Л.Б., Чернышева Н.А. Клинико-лабораторные варианты течения преждевременной недостаточности яичников // Репродуктивное здоровье: матер. II междунар. конгресса по репродукт. медицине. – М., 2008. – С. 211-213.
- 47 Марченко Л.А., Габибуллаева З.Г., Табеева Г.И. Генетические и хромосомные факторы в генезе формирования преждевременной недостаточности яичников // Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний: матер. конгресса. – М., 2007. – С. 576-578.
- 48 Айламазян Э.К. Функциональная морфология плаценты человека в норме и при патологии (нейроиммуноэндокринологические аспекты). – СПб.: Изд-во Н-Л, 2012. – 176 с.
- 49 Терешкевич Д.П. Медико-социальные и эпидемиологические аспекты здоровья населения в зоне экологического бедствия Приаралья: автореф. ... докт. фил. PhD. – Астана, 2011. – 28 с.
- 50 Букунова А.Ш. Общая оценка состояния здоровья беременных женщин в условиях техногенного загрязнения среды обитания человека // Сб. междунаучно-практ. кон. «Проблемы трансграничного загрязнения территорий. – Усть-Каменогорск, 2004. – С. 36-39.
- 51 Букунова А.Ш. Свинец в системе мать – новорожденный как основной критерий опасности химической нагрузки в регионе цветной металлургии. Информационный листок. – Алматы, 2003. – 7 с.
- 52 Камышанский Е.К. Диагностическая значимость CD15-иммунофенотипирования в оценке антенатальной плацентарной недостаточности: дис. ... докт. фил. PhD. – Караганда, 2018. – 145 с.
- 53 Городницкая Е.Э. Роль нарушений обмена фолатов и гомоцистеина в развитии осложнений беременности // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2010. – Т. 10, № 4. – С. 20-24.
- 54 Уварова И.А., Бугаева И.О., Родзаевская Е.Б., Романова Т.П. Структурно - функциональные изменения в плаценте в результате влияния солей тяжелых металлов // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 278-282.
- 55 Сухих Г.Т., Вихляева Е.М., Ванько Л.В. и др. Эндотелиальная дисфункция в генезе перинатальной патологии // Акушерство и гинекология. – 2008. – № 5. – С. 3-7.
- 56 Papanikolaou N.C. Lead toxicity update. A brief review // Med Sci Monit. – 2005. – Vol. 11, № 10. – P. RA 329-336.

- 57 Lafond J. Low environmental contamination by lead in pregnant women: effect on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblasts // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 2004. – Vol. 67, № 14. – P. 1069-1079.
- 58 Koppen G., Den Hond E., Nelen V. Organochlorine and heavy metals in newborns: results from the Flemish Environment and Health Survey (FLEHS 2002–2006) // *Environ Int.* – 2009. – № 35. – P. 1015-1022.
- 59 Neta G., Goldman L.R., Barr D. Distribution and determinants of pesticide mixtures in cord serum using principal component analysis // *Environ Sci Technol.* 2010. – № 44. – P. 5641-5648.
- 60 Turdybekova Y.G., Kelmyalene A.A., Kultanov B.Zh. Clinical laboratory investigation of reproductive health of women living in ecologically unfavorable regions of Kazakhstan // *Gigiena I Sanitariia.* – 2018. – Vol. 97, № 4. – P. 297-300.
- 61 Kultanov B.Z., Bublik G., Kubaev A., Dosmagambetova R.S. Evaluation of Lipo-peroxidation Stress on Sperm of Men Living in Ecologically Disadvantaged Areas of Aral Sea Region // *Biology and Medicine.* – 2015. – Vol. 7, Iss. 5. – № 1-3. – P. 15.
- 62 Okasov D., Ibraibekov Z., Kultanov B., Rakhimova B., Kelmyalene A. The change of products of lipoperoxide cascade in sperm of rats on exposure of dust-salt aerosols of Aral Sea // *FEBS JOURNAL.* – 2017. – № 284. – P. 120-121.
- 63 Бекишев Б.М. Тяжелые металлы и хлорорганические пестициды в питьевой воде как факторы риска хронических эзофагитов в Приаралье: автореф. ... канд. мед. наук: 14.00.07. – Алматы, 2001. – 26 с.
- 64 Досмагамбетова Р.С. Экологические риски и здоровье населения // *Медицина и экология.* – 2014. – № 3. – С. 5-9.
- 65 Проскурина А.С., Невзорова Е.В., Гулин А.В., Засядько К.И. Состояние репродуктивной системы женщин в условиях неблагоприятной экологической обстановки окружающей среды // *Вестник ТГУ.* – 2015. – Т. 20. – Вып. 2. – С. 363-365.
- 66 Meie Wang, Haizhen Zhang. Accumulation of Heavy Metals in Roadside Soil in Urban Area and the Related Impacting Factors // *Int. journal of Environmental Reseach and Public Health* – 2018. – № 15 (6). – P. 1064.
- 67 Singh Jiwan, Kalamdhad Ajay S. Effects of Heavy Metals on Soil, Plants, Human Health and Aquatic Life // *International Journal of Research in Chemistry and Environment.* – 2011. – Vol. 1, Iss. 2. – P. 15-21.
- 68 Zovak A., Sarzynska M., Szpyrka E. Sources of Soil Pollution Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables a Review // *Water, Air and Soil Pollutin.* – 2019. – Vol. 230, Iss. 7. – P. 1-9.
- 69 Засорин Б.В. Особенности иммунного статуса у населения урбанизированных территорий с повышенным содержанием тяжелых металлов // *Гигиена и санитария.* – 2012. – № 3. – С. 17-19.
- 70 Иванов В.С. Роль промышленных предприятий в формировании загрязнения почвенного покрова кобальтом, медью, свинцом // *Вестник Витебского государственного медицинского университета.* – 2011. – Т. 10., № 3. – С. 143-150.

- 71 Мамырбаев А.А. Содержание металлов в волосах и крови детского населения городов Актюбинской области // Гигиена и санитария. – 2012. – № 3. – С. 61-62.
- 72 Сакиев К.З., Ибраева Л.К., Гребенева О.В. Эколого-гигиеническое состояние территорий Приаралья с позиции риска: монография. – Караганда, 2016. – 145 с.
- 73 Айтбембет Б.Н. Накопление вредных химических веществ в организме беременных женщин региона Приаралья // Астана медициналық журналы. – 1999. – № 3. – С. 127-128.
- 74 Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. The effect of cadmium pollution on reproductive health in females // BMJ. – 2004. – № 10. – P. 852- 855.
- 75 Akinloye O., Arowajolu A.O., Shittu O.B., Anetor C.O. Cadmium Toxicity: possible Cause of Male Infertility in Nigeri // Reprod Biol. – 2006. – № 6 (1). – P. 17-30.
- 76 Rahman S.N., Fatima P., Chowdhury A.Q., Rahman M.W. Blood level of lead in women with unexplained infertility // Mymensingh medical journal. – 2013. – № 22 (3). – P. 508-512.
- 77 Кобб М. Поколение: XVII век Ученые, которые раскрыли секреты секса, жизни и роста. – Нью-Йорк: Изд-во Блумсбери, 2006. – 333 с.
- 78 Donovan P.J The germ cell-the mother of all stem cells // International Journal of Developmental Biology. – 1998. – № 42. – P. 1043-1050.
- 79 Witschi E. Migration of the germ cells of the human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds // Contrib Embryology. –1948. – № 209. – P. 67–80.
- 80 Gondos B Development of the reproductive organs // Association of Clinical Scientists. – 1985. – № 15. – P. 363-373.
- 81 Rabinovici J., Jaffe R.B. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads // Endocrine reviews. – 1990. – № 11. – P. 532–557.
- 82 Konishi I., Fujii S., Okamura H., Parmley T., Mori T. Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study // Journal of anatomy. – 1986. – № 148. – P. 121-135.
- 83 Aerts J.M., Bols P.E. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development // Reproduction in Domestic Animals. – 2010. – № 45 (1). – P. 171-179.
- 84 Stoop H., Honecker F., Cools M. Krijger R. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study // Human Reproduction. – 2005. – Vol. 20, Iss. 6. – P. 1466-1476.
- 85 Bonnet A., Cabau C., Bouchez O. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog // BMC Genomics. – 2013. – № 8. – P. 196-201.
- 86 Rimon-Dahari N., Yerushalmi-Heinemann L., Alyagor L., Dekel N. Ovarian Folliculogenesis // Results Probl Cell Differ. – 2016. – № 58. – P. 167-190.
- 87 Gore M.A., Nayudu P.L., Vlaaiisavljevic V. Prediction of ovarian cycle outcome by follicular characteristics // Hum. Reprod. – 1995. – № 10. – P. 2313-2319.

- 88 Jokubkiene L. Assessment of changes in volume and vascularity of the ovaries during the normal menstrual cycle using threedimensional power Doppler ultrasound // *Hum Reprod.* – 2006. – Vol. 21, Iss. 10. – P. 2661-2668.
- 89 Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee H-j., Adams G.B., Niikura Y. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells derived from bone marrow and peripheral blood // *Cell.* – 2005. - № 122. – P. 303-315.
- 90 Kerr J.B., Myers M., Britt K.L., Mladenovska T., Findlay J.K. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply // *Reproduction.* – 2006. – № 132. – P. 95-109.
- 91 Suh E-K., Yang A., Kettenbach A., Bamberger C. P63 protects the female germline during meiotic arrest // *Nature.* – 2006. – № 444. – P. 624-628.
- 92 Findlay J.K., Kerr J.B., Britt K., Liew S.H., Simpson E.R. Rosairo D., Drummond A. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships // *Anim. Reprod.* – 2009. - Vol.6, № 1. – P.16-19.
- 93 Hirshfield A.N. Development of follicles in the mammalian ovary // *Int Rev Cytol.* – 1991. – № 124. – P. 43-101.
- 94 Merchant-Larios H., Chimal-Monroy J. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary // *Prog Clin Biol Res.* – 1989. - № 296. – P. 55-63.
- 95 Simone L., Broer Frank J.M., Broekmans Joop S.E., Laven Bart C.J.M. Fauser Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications // *Human Reproduction Update.* – 2014. – Vol. 20, Iss. 5. – P. 688-701.
- 96 Nandi S., Gupta P.S., Selvaraju S., Roy S.C., Ravindra J.P. Effects of exposure to heavy metals on viability, maturation, fertilization, and embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro // *Arch Environ Contam Toxicol.* – 2010. – № 58 (1). – P. 194-204.
- 97 Michael S. Bloom, Patrick J. Parsons, et al. Toxic trace metals and human oocytes during in vitro fertilization (IVF) // *Reprod Toxicol.* – 2010. – № 29 (3). – P. 298-305.
- 98 Aldo Cavallini, Catia Lippolis, Margherita Vacca, Claudia Nardelli, Alessandra Castegna, Fabio Arnesano The Effects of Chronic Lifelong Activation of the AHR Pathway by Industrial Chemical Pollutants on Female Human Reproduction // *PLoS One.* – 2016. – № 5. – P. 86-92.
- 99 Li Z., Li T., Leng Y., Chen S., Liu Q., Feng J., Chen H., Huang Y., Hormonal changes and folliculogenesis in female offspring of rats exposed to cadmium during gestation and lactation // *Environ Pollut.* – 2018. – № 238. – P. 336-347.
- 100 Ajayi O.O., Charles-Davies M.A., Arinola O.G. Progesterone, selected heavy metals and micronutrients in pregnant Nigerian women with a history of recurrent spontaneous abortion // *Afr Health Sci.* – 2012. – № 12 (2). – P. 153-159.
- 101 Asoke K. Pal, Prafulla S. Ambulkar, Jwalant E. Waghmare, Wankhede V., Shende M.R., Aaditya M. Tarnekar Chromosomal Aberrations in Couples with Pregnancy Loss: A Retrospective Study // *Journal of reproductive science.* – 2018. – 11 (3). – P. 247-253.

- 102 Kasuba V., Rozgaj R., Matek S.M., Blanusa M. Evaluation of genotoxic damage of cadmium chloride in peripheral blood of suckling Wistar rats // *Journal of Applied Toxicology*. – 2002. – Vol. 22, Iss. 4. – P. 271-277.
- 103 Barbosa F. Blood lead and cadmium levels in preschool children and associated risk factors in São Paulo, Brazil // *Environmental Pollution*. – 2018. – Vol. 240. – P. 831-838.
- 104 Alosman M., Yang F., Yaw Massey I. Exposure routes and health effects of heavy metals on children // *BioMetals*. – 2019. – № 32 (20). – P. 1-19.
- 105 Navas-Acien A., Selvin E., Sharrett A.R., Calderon-Aranda E., Silbergeld E., Guallar E. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease // *Circulation*. – 2004. – № 109 (25). – P. 3196-3201.
- 106 Kodama H., Yamaguchi R., Fukuda J., Kasai H., Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients // *Fertil. Steril.* – 1997. – № 68. – P. 519-524.
- 107 Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa // *Hum. Reprod.* – 1998. – № 13. – P. 896-900.
- 108 Zenzes M.T. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos // *Hum. Reprod.* – 2000. – Update 6. – P. 122-123.
- 109 Badouard C., Menezo Y., Panteix G. Determination of new types of DNA lesions in human sperm // *Zygote*. – 2008. – № 16. – P. 9-13.
- 110 Martin-Romero F. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2008. – Vol. 17, Iss. 5. – P. 652-661.
- 111 Андруз Дж., Бримблекумб П., Джикелз Т., Лисс П. Введение в химию окружающей среды / пер. с англ. – М.: Мир, 1999. – С. 271.
- 112 Bockris J. O'M. *Environmental Chemistry*. – 1977. – P. 119
- 113 Coman G., Draghici C., Chirilla C., Sica M. Pollutans Effect on human body – toxcolological approach // *Hemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*. – 2006. – P. 255-266.
- 114 Скоблин А.П. Микроэлементы в костной ткани / под ред. А.М. Белоус. – М.: Медицина, 1968. – 232 с.
- 115 Andrews N.C. Disorders of iron metabolism // *N Engl J Med*. – 1999. – Vol. 341. – P. 1986-1995.
- 116 Kohgo Y., Ikuta K, Ohtake T., Torimoto Y. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload // *International Journal of Hematology*. – 2008. – № 88 (1). – P. 7-15.
- 117 Crichton R.R., Wilmet S., Legssyer R., Ward R.J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells // *Journal Inorg Biochem*. – 2002. – № 91. – P. 9-18.
- 118 Franchini M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment // *American Journal of Hematology*. – 2006. – № 81. – P. 202-209.

- 119 Okada I.A., Sakuma A.M., Maid F.D., Dovidemskas S. Evaluation of lead and cadmium in milk due to environmental contamination in Paraiba valley region of South Eastern Brazil // *Raissade-Saude-Publica.* – 1997. – Vol. 31. – P. 140-143.
- 120 Patra R.C., Swarup D., Naresh R. Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2007. – Vol. 66, № 1. – P. 127-131.
- 121 Swarup D., Patra R.C., Naresh R., Kumar P., Shekhar P. Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk // *Science of the Total Environment.* – 2005. – Vol. 347, № 1-3. – P. 106-111.
- 122 Humphreys D.J. Effects of exposure to excessive quantities of lead on animals // *British Veterinary Journal.* – 1991. – Vol. 147, № 1. – P. 18-30.
- 123 Khalil-Manesh F., Gonick H.C., Weiler E.W.J., Prins B., Weber M.A., Purdy R.E. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors // *American Journal of Hypertension.* – 1993. – Vol. 6, № 9. – P. 723-729.
- 124 Sharma R.P., Street J.C. Public health aspects of toxic heavy metals in animal feeds // *Journal of the American Veterinary Medical Association.* – 1980. – Vol. 177, № 2. – P. 149-153.
- 125 Neveri B. Metal toxicity and resperatoty tract // *Europion resperatoty journal.* – 1990. – P. 202-19
- 126 Lin Yen-Chih, Lian Ie-Bin, Kor Chew-Teng, Chia-Chu Chang, Pei-Yuan Su, Wan-Tzu Chang, Yu-Fen Liang, Wei-Wen Su, Maw-Soan Soon. Association between soil heavy metals and fatty liver disease in men in Taiwan: a cross sectional study // *BMJ.* – 2017. – № 7 (1). – P. 014215.
- 127 Хасенова К.Х., Байжанова Н.С., Рослякова Е.М., Игибаева Е.М., Бисерова А.Г. Экологический мониторинг Аральского региона, влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на организм // *Междунар. журнал эксперимент. образования.* – 2014. – № 5. – Ч. 2. – С. 18-20.
- 128 Брусенко Л.А., Сосновская Л.В. Состояние окислительного метаболизма при воздействии полиметаллической пылью в эксперименте // *Вестник КарГУ. Серия Биология, медицина, география.* – 2006. – № 2. – С. 10-14.
- 129 Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress // *Am.J. Physiol.* 2008. Vol. 295, № 4. – P. 849-868.
- 130 Harman D. Aging<sup>^</sup> a theory based on free radical and radiation chemistry // *J. Gerontol.* – 1956. – Vol. 11, № 3. – P. 298-300.
- 131 Акбарходжаева Х.Н., Алимходжаева Н.Т., Ташходжаева А.А. Изменение интенсивности перекисного окисления липидов и активности ферментов антиокислительной системы (СОД, каталазы) у экспериментальных крыс при интоксикации ксенобиотиками // *Молодой ученый.* – 2016. – № 10. – С. 389-392.
- 132 Ivasenko S.A., Rakhimova B.B., Kelmyalene A.A., Kultanov B.Zh. The state of oxidative stress in the body of women living in the Sub-Aral area // *15th world congress on Biotechnology and biotech industries meet & 2 nd international conference on Enzymology and molecular biology.* – 2017. – Vol. 7, Iss. 1. – P. 95.

- 133 Riley P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation // *International Journal of Radical in Biology*. – 1994. – Vol. 65. – P. 27-33.
- 134 Яшин А., Яшин Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография маркеров окислительного стресса // *Методология*. – 2011. – № 1. – С. 34-43.
- 135 Lenarzyk M., Cohen E.P. Chronic Oxidative Stress as a Mechanism for Radiation Nephropathy: author manuscript. – 2009. – P. 164-172.
- 136 Zakaria K.M. Effect of Gamma Ray on Reactive Oxygen Species at Experimental Animals // *OMICS Journal of Radiology*. – 2017. – Vol. 6 (6). – P. 283.
- 137 Migliaccio V., Scudiero R., Sica R., Lionetti L., Putti R. Oxidative stress and mitochondrial uncoupling protein 2 expression in hepatic steatosis induced by exposure to xenobiotic DDE and high fat diet in male Wistar rats // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14 (4). : e0215955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215955>
- 138 Alchalabi Ali S.H., Hasliza R., Aklilu E., Al-Sultan I., Malek R.H., Ronald S.H. Histopathological changes associated with oxidative stress induced by electromagnetic waves in rats' ovarian and uterine tissues // *Asian Pacific Journal of Reproduction* – 2016. – Vol. 5, Iss. 4. – P. 301-310.
- 139 Silveira A.S., Aydos R.D., Ramalho R.T., Silva I.S., Caldas R.A., Santos Neto A.T., Rodrigues C.T. Oxidative stress effects in the uterus, placenta and fetus of pregnant rats submitted to acute and chronic stress // *Acta Cirurgica Brasileira* 2018. – Vol. 33, № 9. – P. 806-815.
- 140 Murawska-Ciałowicz E., Bal W., Januszewska L., Zawadzki M., Rychel J., Zuwała-Jagiełło J. Oxidative Stress Level in the Testes of Mice and Rats during Nickel Intoxication // *Scientific World Journal*. – 2012. – P. 395741.
- 141 Shahat E.L., Abd El-Rahman, Abdel-Raheim and Mehana, El-Saed. Altered Testicular Morphology and Oxidative Stress Induced by Cadmium in Experimental Rats and Protective Effect of Simultaneous Green Tea Extract // *International Journal of Morphology*. – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 757-764.
- 142 Maghraoui S., Ahlem A., Clichici S., Login C. Oxidative stress in blood and testicle of rat following intraperitoneal administration of aluminum and indium // *Acta Physiologica Hungarica*. – 2013. – № 101 (1). – P. 1-12.
- 143 Richard M. Sharpe Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2010. – № 365 (1546). – P. 1697-1712.
- 144 Demidyuk I., Rafieva L.M., Kostrov S.V., Shubin A.V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival // *Oncotarget*. – 2016. – № 7 (34). – P. 55863-55889.
- 145 Sinha S. Lipid Peroxidation and its Impact on Infertility // *Open Access Journal: Women's Health & Gynecology*. – 2018. – Vol.4, Iss. 1 – P. 1-10.
- 146 Benkhalifa M., Montjean D., Cohen-Bacrie P., Ménézo Y RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte // *Fertil Steril*. – 2010. – № 93 (5). – P. 1585-90.
- 147 Matorras R., Ruiz J.I., Mendoza R., Ruiz N., Sanjurjo P., Rodriguez-Escudero F.J. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes // *Hum Reprod*. – 1998. – № 13 (8). – P. 2227-30.

- 148 Pallav Sengupta. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's // *Int J Prev Med.* – 2013. – № 4 (6). – P. 624-630.
- 149 Об утверждении правил доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан. Приказ Министра Здравоохранения от 25 июля 2007 года, № 442. [www.tengrinews.kz](http://www.tengrinews.kz). 10.09.2016.
- 150 Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.
- 151 Елевская Л.Т. Модели экспериментального пневмокониоза и пылевого бронхита при ингаляционном воздействии // *Гигиена и санитария.* – 1974. – № 4. – С. 72-75.
- 152 Борисова Л.Б., Мареева Л.Б., Досмагамбетова Р.С. Ингаляционная заправка животных пылью в токсикологическом эксперименте. Метод. рекомендации. – Алматы, 1997. – 17 с.
- 153 Hoehne L. Determination of Cd in Blood by Microwave-Induced Combustion Coupled to Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 21, № 6. – P. 978-984.
- 154 Корогод Н.П., Шаймарданова Б.Х., Асылбекова Г.Е. Оценка накопления токсичных элементов в биосубстратах промышленного центра Казахстана // *Современные проблемы науки и образования.* – 2009. – № 6. – С. 132-136.
- 155 Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. Mouse zona pellucida genes and glycoproteins // *Cytogenet Genome Res.* – 2004. – Vol. 105. – P. 228-34.
- 156 Oehninger S. Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida // *Reprod BioMed Online.* – 2003. – № 7. – P. 641-8.
- 157 Lefievre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human // *Hum Reprod.* – 2004. – Vol. 19. – P. 1580-6.
- 158 Tajima K., Oricaka M., Mori T., Kotsuji F. Ovarian cells in follicular function // *Reproductive BioMedicine Online.* – 2007. – Vol. 15, № 5. – P. 591-609.
- 159 Magoffin Denis A. Ovarian theca cell // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2005. – Vol. 37(7). – P. 1344-9.
- 160 Schmid W. The micronucleus test: Metodological aspects // *Mutat.Res.* – 1973. – Vol. 19. – P. 109-117.
- 161 Heddle J.A., Salamone M.F. Chromosomalaberration and bone marrow toxicity // *Environ.Perspective.* – 1981. – Vol. 39. – P. 29-33.
- 162 Wakata A., Miyamae Y., Sato S., Suzuki T., Morita T., Asano N., Awogi T., Kondo K., Hayashi M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT // *JEMS. Environ Mol Mutagen.* – 1998. – Vol. 32 (1). – P. 84-100.
- 163 Doherty St., Bryce J.M., Bemis C. Genetic Toxicology Testing A Laboratory Manual // *The In Vitro Micronucleus Assay.* – 2016. – Chapt. 6. – P. 161-205.

- 164 Jeffrey C. Bemis. Comparison of in vitro and in vivo clastogenic potency based on benchmark dose analysis of flow cytometric micronucleus data // *Mutagenesis*. – 2016. – Vol. 31 (3). – P. 277-285.
- 165 Пат. 2627672 Российская Федерация. Способ приготовления цитологических препаратов метафазных хромосом / Овсепян В.А., Сарпова М.В; заявление № 2016137082, опубликовано 09.08.2017, Бюл. № 22
- 166 Коробейникова Э.Н. Методы определения малонового диальдегида в плазме крови // *Лаб. дело*. – 1989. – № 7. – С. 8-10.
- 167 Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов при хронических заболеваниях печени у детей // *Лаб. дело*. – 1990. – № 8. – С. 19-22.
- 168 Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
- 169 Элдер К., Дэйл Б. Экстрокорпоральное оплодотворение / пер. с англ.; под ред. Е. Горностаева, С. Дьяконова – М.: МЕЛПресс-информ, 2008. – 304 с.
- 170 Appazova L.S., Kamyshanskiy Y.K., Kultanov V. Zh., Korobaeva I.L. Violation in the utero-placental complex in pregnant female rats during dust intoxication-salt aerosols of the Aral Sea // Тезис на конференцию the Leiden International (Bio)Medical Student Conference. – Leiden, 2019. – С. 58.
- 171 Buchman A.L., Neely M., Grossie V.B Jr., Truong L., Lykissa E., Ahn C. Organ heavy-metal accumulation during parenteral nutrition is associated with pathologic abnormalities in rats // *Nutrition*. – 2001. – Vol. 17 (7-8). – P. 600-6.
- 172 Bench G., Corzett M.H., Martinelli R., Balhorn R. Cadmium concentrations in the testes, sperm, and spermatids of mice subjected to long-term cadmium chloride exposure // *Cytometry*. – 1999. – Vol. 35 (1). – P. 30-6.
- 173 Ozen O.A., Yaman M., Sarsilmaz M., Songur A., Kus I. Testicular zinc, copper and iron concentrations in male rats exposed to subacute and subchronic formaldehyde gas inhalation // *J Trace Elem Med Biol*. – 2002. – Vol. 16 (2). – P. 119-22.
- 174 Турдыбекова Я.Г., Есимова Р.Ж., Култанов Б.Ж., Пудов А.М. Влияние пыле-солевых аэрозолей Аральского моря на ткани яичников» // *Матер. серии конф. ЗКГМУ им. Марата Оспанова*. – 2018. – Т. 5. – С. 107-111.
- 175 Довжикова М.И., Луценко М.Т. Современные представления о роли эстрогенов во время беременности (обзор литературы) // *Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания*. – 2016. – Вып. 61. – С. 120-127.
- 176 Миньженковой М.Е. Метафазная сравнительная геномная гибридизация в диагностике хромосомного дисбаланса: автореф. ... канд. мед. наук: генетика. – М., 2014. – С. 131.
- 177 O’Rahilly R. Early human development and the chief sources of information on staged human embryos // *Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol*. – 1979. – Vol. 9. – P. 273-280.
- 178 Nottola S.A., Makabe S., Familiari G., Stallone T. Surface morphology of the zona pellucida surrounding human blastocyst obtained after in vitro fertilization // *Archives of Histology and Cytology*. – 2005. – Vol. 68 (2). – P. 133-41.

- 179 Hossain M.I., O'Shea J.D. The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig // *J. Anat.* – 1983. – № 137 (Pt 3). – P. 457-66.
- 180 Gandin V., Pellei M., Tisato F., Porchia M., Santini C., Marzano C. A novel copper complex induces paraptosis in colon cancer cells via the activation of ER stress signalling // *J Cell Mol Med.* – 2012. – Vol. 16. – P. 142-151.
- 181 Korsnes M.S., Espenes A., Hetland D.L., Hermansen L.C. Paraptosis-like cell death induced by yessotoxin // *Toxicol In Vitro.* – 2011. – Vol. 25. – P. 1764-1770.
- 182 Bhattacharjee P., Giri B., Gomes A. Apoptogenic activity and toxicity studies of a cytotoxic protein (BMP1) from the aqueous extract of common Indian toad (*Bufo melanostictus* Schneider) skin // *Toxicon.* – 2011. – Vol. 57. – P. 225-236.
- 183 Zhang F.J., Yang J.Y., Mou Y.H., Sun B.S., Wang J.M., Wu C.F. Oligomer procyanidins from grape seeds induce a paraptosis-like programmed cell death in human glioblastoma U-87 cells // *Pharm Biol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 883-890.
- 184 Rogers-Cotrone T., Burgess M.P., Hancock S.H., Hinckley J., Lowe K., Ehrich M.F., Jortner B.S. Vacuolation of sensory ganglion neuron cytoplasm in rats with long-term exposure to organophosphates // *Toxicol Pathol.* – 2010. – Vol. 38. – P. 554-559.
- 185 Bolognesi C., Moretto A. Genotoxic risk in rubber manufacturing industry: a systematic review // *Toxicol. Lett.* 2014. – Vol. 230, № 2. – P. 345-355.
- 186 Angelini S., Bermejo J.L., Ravegnini G. Application of the lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay to populations exposed to petroleum and its derivatives: Results from a systematic review and meta-analysis // *Mutat. Res.* – 2016. – Vol. 770 (Pt A). – P. 58-72.
- 187 Aseeva E.A., Snigireva G.P., Neverova A.L. Multiaberrant cells in groups of people exposed to radiation in different situations and their possible biological role // *Biophysics.* – 2010. – Vol. 55. – P. 496-503.
- 188 Harmanescu M., Alda L.M., Bordean D.M. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania // *Chem. Cent. J.* – 2011. – Vol. 5, № 64. – P. 1-10.
- 189 Газизова А.О. Влияние соле-пылевого аэрозоля Аральского моря на органы дыхания (экспериментальное исследование): дис. ... док. фил. PhD. – Караганда, 2018. – 108 р.
- 190 Turdybekova Y.G., Kelmyalene A.A., Kultanov B.Zh. Clinical laboratory investigation of reproductive health of women living in ecologically unfavorable regions of Kazakhstan // *Gigienea I Sanitariia.* – 2018. – Vol. 97, Iss. 4. – P. 297-300.
- 191 Кубаев А.Б., Ибрайбеков Ж.Г., Култанов Б.Ж. Оценка функционального состояния щитовидной железы среди женщин экологически неблагоприятного региона приаралья (г. Шалкар) // Молодой исследователь: вызовы и перспективы: сб. ст. по матер. VI междунар. науч.-практ. конф. «Молодой исследователь: вызовы и перспективы». – М.: Изд. «Интернаука», 2016. – № 4 (6). – С. 52-56.

- 192 Күбаев А.Б. The analysis of women's reproductive health in subclinical hypothyroidism in ecologically unfavorable Kyzylorda region (Kazakhstan) // *Biology and Medicine, International Open Access Journal*. – 2015. – Vol. 7. – P. BM068.15.
- 193 Helmut I. Roach, Broner F. Epigenetics aspects of chronic diseases. – Springer, 2011. – P. 237.
- 194 Blaustein A. Anatomy and Histology of the Human Ovary Pathology of the Female Genital Tract. – Springer, 1982. – P. 365-386.
- 195 Мяделец О.Д. Гистология, цитология и эмбриология человека. – Витебск, 2014. – Ч. 1. – С. 439.
- 196 Бурганова Г.Р., Гумерова А.А., Андреева Д.И., Плюшкина А.С., Певнев Г.О., Киясов А.П. Женская половая система: учебно-методическое пособие. – Казань, 2018. – С. 47.
- 197 Emori M.M., Drapkin R. The hormonal composition of follicular fluid and its implications for ovarian cancer pathogenesis // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2014. – Vol. 12, № 60 :<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-60>
- 198 De los Santos M.J., Garcia-Laez V., Beltran D., Labarta E., Zuzuarregui J.L., Alama P., Gamiz P., Crespo J., Bosch E., Pellicer A. The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: is it hypoandrogenic? // *Hum Reprod*. – 2013. – Vol. 28. – P. 224-229.
- 199 Jiarui Sun, Yinan Cao, Xinchun Zhang, Qiling Zhao. Ovarian Toxicity in Female Rats after Oral Administration of Melamine or Melamine and Cyanuric Acid // *Public Library of Science*. – 2016. – Vol. 11 (2): e0149063
- 200 Jie Cui, Yong Shen, Rena Li. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain: author manuscript. PMC – 2013. – Vol. 19 (3). – P. 197-209.
- 201 Ting A.Y., Xu J., Stouffer R.L. Differential effects of estrogen and progesterone on development of primate secondary follicles in a steroid-depleted milieu in vitro // *Human reproduction*. – 2015. – Vol. 30 (8). – P. 1907-1917.
- 202 Gomez B.I., Aloqaily B.H., Gifford C.A., Hallford D.M., Hernandez Gifford J.A. ASAS-SSR Triennial Reproduction Symposium: Looking Back and Moving Forward-How Reproductive Physiology has Evolved: WNTs role in bovine folliculogenesis and estrogen production // *Journal of animal science*. – 2018. – Vol. 96 (7). – P. 2977-2986.
- 203 Колумбаева С.Ж., Бегимбетова Д.А., Ловинская А.В., Калимагамбетов А.М. Содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в печени лабораторных крыс при воздействии фипронила и фипронил-сульфона // *Вестник КазНМУ*. – 2015. – С. 316-319.
- 204 Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: Наука. Интерпериодика, 2001. – 343 с.
- 205 Кантюков С.А., Кривохижина Л.В., Фархутдинов Р.Р. Состояние процессов свободно-радикального окисления при остром поражении печени // *Вестник ЮурГУ*. – 2011. – № 39. – С. 107-111.

206 Орлов Ю.П. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия при критических состояниях // Вестн. интенс. терапии. – 2008. – Т. 1. – С. 73-77.

207 Monisha Jaishankar, Tenzin Tseten, Naresh Anbalagan, Blessy B. Mathew, and Krishnamurthy N. Beeregowda Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals // Interdiscip Toxicology. – 2014. – Vol. 7 (2). – P. 60-72.

208 Nabil M.I. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat // Asian Pacific J. of Tropical Biomed. – 2011. – Vol. 2. – P. 41-46.

209 Kasten-Jolly J., Heo Y., Lawrence D.A. Impact of developmental lead exposure on splenic factor // Toxicol. and App. Pharm. – 2010. – Vol. 247. – P. 105-115.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права № 1

<b>СВИДЕТЕЛЬСТВО</b> о государственной регистрации прав на объект авторского права	№ <u>0192</u> 17 ноября 2017 г.
<p>Настоящим удостоверяется, что в Министерстве юстиции Республики Казахстан зарегистрированы исключительные имущественные права на объект авторского права под названием «Оценка окислительного стресса в крови и тканях экспериментальных животных при воздействии пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря» (произведение науки), авторами которого по заявлению авторов являются Турдыбекова Яминур Габдуллаковна, Култанов Берикбай Жукенович, Ибрайбеков Жанболат Габитович, Окасов Дидар Бекежанович.</p> <p>По заявлению авторов исключительные имущественные права на объект авторского права, созданный 5 июня 2017 года, принадлежат Турдыбековой Я.Г., Култанову Б.Ж., Ибрайбекову Ж.Г., Окасову Д.Б. и авторы гарантируют, что при создании вышеуказанного объекта не были нарушены права интеллектуальной собственности других лиц.</p> <p>Запись в реестре за № <u>0192</u> от 17 ноября 2017 года имеется.</p>	
Заместитель министра Э. Азимова	
ИС 0192	

Авторлық құқық объектісіне құқықтарды мемлекеттік тіркеу туралы	№ <u>0192</u> 17 қараша 2017 ж.
<b>ҚУӘЛІК</b>	
<p>Қазақстан Республикасы Әділет министрлігінде авторлардың етіміші бойынша авторлар Яминур Габдуллаковна Турдыбекова, Берикбай Жукенович Култанов, Жанболат Габитович Ибрайбеков, Дидар Бекежанович Окасов болып табылатын авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша мүлкілік құқықтар «Оценка окислительного стресса в крови и тканях экспериментальных животных при воздействии пыле-солевыми аэрозолями Аральского моря» (ғылыми туынды) атауымен тіркелгені куәландырылады.</p> <p>Авторлардың етіміші бойынша авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша мүлкілік құқықтар және 2017 жылғы 5 маусымда жасалған объекті Я.Г. Турдыбековаға, Б.Ж. Култановқа, Ж.Г. Ибрайбековке, Д.Б. Окасовқа тиесілі және авторлар жоғарыда көрсетілген объектіні жасаған кезде басқа адамдардың зияткерлік меншік құқығы бұзылмағандығына кепілдік береді.</p> <p>Тізілімде 2017 жылғы 17 қарашада жасалған № <u>0192</u> жазба бар.</p>	
Министрдің орынбасары Э. Азимова	

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Акт исследования дисперсии пыли

Акт

выполненных работ Пудовым Александром Михайловичем на содержание химических веществ в образце пыли и дисперсию частиц пы

Анализ проб на содержание химических веществ проводился в лабораторных условиях методом атомной абсорбции на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре Varian AA 140 (Австралия) и двухлучевым сканирующим спектрофотометре UV-1800 Shimadzu (Япония).

Все химические анализы проведены на базе лаборатории инженера профиля «Физико-химические методы исследования» КарГУ им. Букутова. Лаборатория расположена по адресу 100028, г.Караганды, Муканова 41.

Лаборатория аккредитована в системе аккредитации Республики Казахстан на соответствие требованиям СТ РК ИСО/МЭК 17025-1:2007 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (Аттестат аккредитации №KZ.И.10.0745 от 2 июля 2015 года).

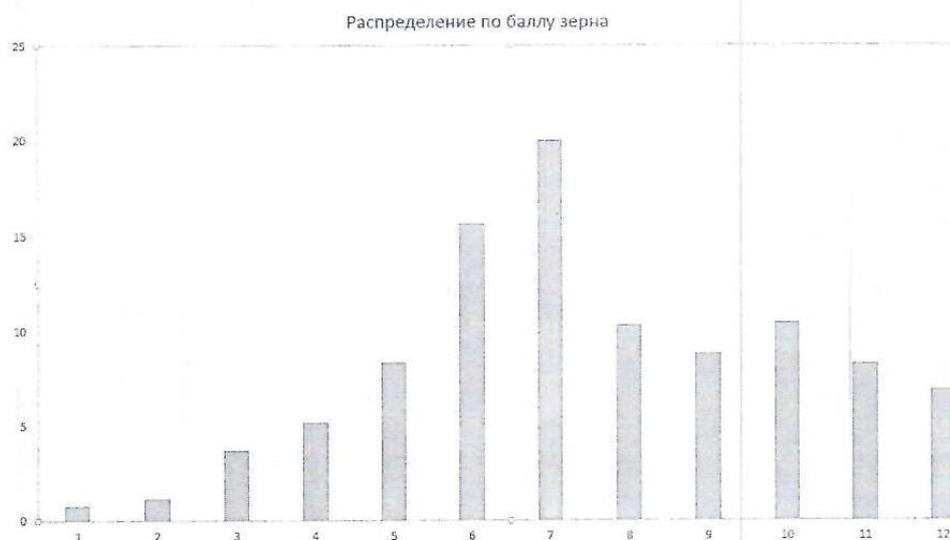
Дисперсия определялась на микроскопе AMPLIVAL (Carl Zeiss Jena)

#### Дисперсия образца пыли

Данные статистики

Количество полей – 1;  
Площадь поля, мм – 3,50;  
Обработанная площадь – 3,00;  
Количество зерен – 8144;  
Количество зерен на мм<sup>2</sup> – 2714;  
Баллы зерна – 7;

#### Диаграмма распределения по баллу зерна



Описание дисперсности на диаграмме и таблице

Цифре 1 на диаграмме и таблице соответствует размер 0,7 мм<sup>2</sup>, цифре 2 - 0,6 мм<sup>2</sup>, цифре 3 - 0,5 мм<sup>2</sup>, цифре 4 - 0,4 мм<sup>2</sup>; цифре 5 - 0,3 мм<sup>2</sup>; цифре 6 - 0,2 мм<sup>2</sup>; цифре 7 - 0,1 мм<sup>2</sup>; цифре 8 - 0,09 мм<sup>2</sup>; цифре 9 - 0,08 мм<sup>2</sup>; цифре 10 - 0,07 мм<sup>2</sup>; цифре 11 - 0,06 мм<sup>2</sup> и цифре 12 - < 0,05 мм<sup>2</sup>.

Таким образом наибольшее количество частиц представлено размерами 0,2 и 0,3 мм<sup>2</sup>, 15,72 и 20,02 % соответственно

Таблица распределения по баллу зерна в %

0,78	1,15	3,75	5,19	8,36	15,72	20,02	10,37	8,86	10,53	8,32	6,95
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Специалист ИЛ ФХМИ

 Пудов А.М.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Акт исследования химического состава пыли



KZ II 10.0745

Испытательная лаборатория инженерного профиля  
Физико-химические методы исследования КарГУ им. Е.А. Букетова  
г. Караганда ул. Муканова 41

Аттестат аккредитации  
№ KZ.И/10.0755

Всего страниц 1  
Страница 1

Протокол испытаний №\_45\_ от " 13 " октября\_ 2016 г.

Наименование и обозначение испытываемых образцов: пыль

Место отбора: Химический факультет КарГУ

Отбор образца проведен по СТ РК 1289-2004

Количество (образцов 1), анализов 2

Вид испытаний: испытания на содержание металлов

Заказчик:

Испытания проведены по СТ РК ИСО 11047-2008 атомно-абсорбционный метод.

Окружающая среда  $t = 22^{\circ}\text{C}$ , влажность 45 %

Таблица 1 – Содержание в пробах Cd, Pb (мг/л)

Наименование (химический элемент)	Единица измерения	Результаты	
Cd	$\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ %	4.3	
Pb	$\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ %	2.25	=

Результаты испытаний распространяются только на образцы, по завершению испытаний

Примечание: Частичная перепечатка протокола испытаний без разрешения  
Испытательной лаборатории запрещена

Специалист ИЛ:

Пудов А.М.

# ПРИЛОЖЕНИЕ Г

## Акт атомно-абсорбционного исследования ткани яичников



Испытательная лаборатория инженерного профиля  
«Физико-химические методы исследований»  
КарГУ им. Е.А. Букетова  
г. Караганда, ул. Муканова, 41 тел. 79-15-76

Аттестат аккредитации  
№ KZ.И/10.0745

Всего страниц 1  
Страница 1

Протокол испытаний № 22 от "15" марта 2017 г.

Наименование и обозначение испытываемого образца: Пыль (кумуляция в тканях)  
Дата получения образца: 01 марта 2017 года  
Количество образца: проб 2, анализов 28  
Наименование (фамилия) и адрес заказчика: Турдыбекова Я.Г.  
Место отбора: Арал (пыль), ткани КГМУ  
Вид испытаний: Определение содержания меди, цинка, свинца, кадмия  
Дата проведения анализа: 14 марта 2017 года  
Испытания проведены по СТ РК ИСО 11047-2008 атомно-абсорбционный метод  
Условия проведения анализа: окружающая среда t = 19.4°C, влажность 41 %

Таблица 1 – Содержание в пробах Cu, Zn, Pb, Cd (мг/кг)

Наименование (химический элемент)	Результаты								
	1(з)	2(к)	3(з)	4(к)	5(з)	6(к)	7(з)	(з) среднее	(к) среднее
<b>Cu</b>	3.5	3.0	3.7	2.7	3.6	3.0	3.5	3.6	2.9
<b>Zn</b>	38.3	15.8	42.5	14.6	40.3	14.9	41.2	40.58	15.1
<b>Pb</b>	0.09	0.04	0.12	0.05	0.11	0.05	0.14	0.12	0.05
<b>Cd</b>	0.07	0.02	0.06	0.02	0.08	0.02	0.08	0.07	0.02

Результаты испытаний распространяются только на образцы, подвергнутые испытаниям

Примечание: Частичная перепечатка протокола испытаний без разрешения Испытательной лаборатории запрещена

Руководитель ИЛ, ответственный  
за подготовку протокола испытаний

\_\_\_\_\_ Мустафин Е.С.

Специалист ИЛ

\_\_\_\_\_ Пудов А.М.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### Акт внедрения в учебный процесс

Ф НАО «МУК» 6-2-06

ПП НАО «МУК» 6-2

Проректор по академической работе



#### АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС

Медицинский Университет Караганды- кафедра биологии

**Наименование предложения:** Методика цитогенетического исследования мазков костного мозга лабораторных животных

**Работа включена из:** результатов докторской диссертации Турдыбековой Я.Г. по теме «Оценка фолликулогенеза и геномной нестабильности у самок белых крыс и их потомства при ингаляционном воздействии химическими загрязнителями (экспериментальное исследование)»

**Форма внедрения:** методика проведения самостоятельного лабораторного исследования обучающимся по всем дисциплинам студентам бакалавриата и магистрантам.

**Ответственные за внедрение:** Есильбаева Б.Т., Татина Е.С., Турдыбекова Я.Г.

**Эффективность внедрения:** позволит сформировать у обучающихся навыки гипотонизации, фиксации и приготовления качественных стеклопрепаратов, анализ метафазных пластин для подсчета хромосомных aberrаций.

**Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение**

**Рекомендуется:** применять в качестве методики проведения лабораторного занятия по теме «цитогенетические исследования» для всех специальностей бакалавриата и магистрантов

**Сроки внедрения** 2019год

**Председатель комиссии, к.х.н., доцент**

Рахимова Б.Б.

**Члены, ответственные за внедрение  
К.б.н.**

Есильбаева Б.Т.

Татина Е.С.

Турдыбекова Я.Г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

### Акт внедрения в учебный процесс

Ф НАО «МУК» 6-2-06

ПП НАО «МУК» 6-2

Проректор по академической работе

Риктефс В.И.



#### АКТ

#### ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС

Медицинский Университет Караганды- кафедра морфологии и физиологии

**Наименование предложения:** Методика проведения структурной оценки фолликулярного состояния яичников экспериментальных животных

**Работа включена из:** результатов докторской диссертации Турдыбековой Я.Г. по теме «Оценка фолликулогенеза и геномной нестабильности у самок белых крыс и их потомства при ингаляционном воздействии химическими загрязнителями (экспериментальное исследование)»

**Форма внедрения:** методика проведения самостоятельного лабораторного исследования обучающимся по всем дисциплинам студентам бакалавриата.

**Ответственные за внедрение:** Жанайдарова Г.О., Берикбаева Б.К., Турдыбекова Я.Г.

**Эффективность внедрения:** позволит сформировать у обучающихся навыки морфо-физиологических исследований тканей яичников на тканевом и клеточном уровне.

**Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение**

**Рекомендуется:** применять в качестве методики проведения лабораторного занятия по теме «гистологическое исследование органов репродуктивной системы» для всех специальностей бакалавриата.

**Сроки внедрения** 2019год

**Председатель комиссии, профессор**

Жанайдарова Г.О

**Члены, ответственные за внедрение**

Берикбаева Б.К.,  
Есимова Р.Ж.  
Турдыбекова Я.Г.

# ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

## Акт внедрения

Ф НАО «МУК» 6-2-06

ПП НАО «МУК» 6-2

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач «Институт Общественного здоровья  
и Профессионального здоровья»

А.У. Аманбекова



АКТ

### внедрения результатов научно- исследовательской работы

«Институт Общественного здоровья и профессионального здоровья», Клиника профессионального здоровья.

**Наименование предложения:** Методика проведения биохимических методов исследования тканей.

**Работа включена** в инициативном порядке из докторской диссертации Турдыбековой Я.Г. по теме «Оценка фолликулогенеза и геномной нестабильности у самок белых крыс и их потомства при ингаляционном воздействии химическими загрязнителями (экспериментальное исследование)»

**Форма внедрения:** методика проведения биохимического исследования тканей для врачей лаборантов

**Ответственные за внедрение:** врач- лаборант Декамбаева Ш.Е., врач- лаборант Ынтыбекова А.Ж.

**Эффективность внедрения:** позволит расширить знания врачей лаборантов, занимающихся изучением биохимических процессов в крови и тканях организма и оптимизировать лабораторно- биохимические исследования тканей яичников.

**Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение**

**Председатель:**

Сроки внедрения 2019год

Председатель комиссии, заведующая  
консультативно диагностическим  
отделением

Акынжанова С.

Члены, ответственные за внедрение

врач- лаборант Декамбаева Ш.Е., врач-  
лаборант Ынтыбекова А.Ж.