

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ГЕНЕРАТИВНОГО АППАРАТА ЯИЧНИКОВ КРЫС ПОСЛЕ ДВУХСТОРОННЕЙ ПЕРЕВЯЗКИ ВНУТРЕННИХ ПОДВЗДОШНЫХ АРТЕРИЙ В УСЛОВИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ КСИМЕДОНОМ И МЕЛАТОНИНОМ

ЧАИРКИН И.Н.¹, МОРОЗОВ В.Е.¹, ЧАИРКИНА Н.В.², МАКОЛОВА Ю.И.³, АБРАМОВА А.В., ПАРШИН А.А.¹, МИШЕЧКИН М.М.¹ МОИСЕЕВА Т.В.⁴

THE COMPARATIVE MORPHOLOGICALLY QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE STATE OF THE REPRODUCTIVE APPARATUS OF RAT GONADS AFTER THE DOUBLE BANDAGING OF INTERNAL ILIAC ARTERIES UNDER THE CONDITIONS OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION BY XYMEDONE AND MELATONIN

CHAIRKIN I.N., MOROZOV V.E., MAKHOLOVA J.I., CHAIRKINA N.V., ABRAMOVA A.V., PARSHIN A.A., MISHECHKIN M.M.

¹Кафедра нормальной анатомии человека с курсами судебной медицины, топографической анатомии и оперативной хирургии (зав. кафедрой- профессор И.Н.Чаиркин) ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева», г.Саранск; ²Кафедра патологии с курсом патологической физиологии (зав. кафедрой- профессор Н.А.Плотникова) ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им.Н.П.Огарева», г.Саранск; ³ГБУЗ РМ «Городская поликлиника № 8», г.Саранск; ⁴Научно-исследовательская лаборатория по проблемам морфологии (руководитель – профессор И.И.Марков) НОУ ВПО Медицинский институт «Реавиз».

Двухсторонняя перевязка внутренних подвздошных артерий вызывает нарушение фолликулогенеза, выражающееся уменьшением числа первичных и растущих фолликулов и нарастанием процессов атрезии фолликулов. Уменьшение числа желтых тел в срезах яичников крыс свидетельствует о нарушении лютеогенеза на всех сроках эксперимента (180 суток). На фоне введения препаратов с антиоксидантной активностью мелатонина и ксимедона уже с 30 суток эксперимента наблюдается улучшение морфоколичественных показателей в срезах яичников крыс с двухсторонней перевязкой внутренних подвздошных артерий. Исследование показало, что мелатонин способствует лучшему восстановлению фолликулогенеза и лютеогенеза, чем ксимедон. На фоне введения мелатонина количество первичных и растущих фолликулов, а также желтых тел к 180 суткам после перевязки ВПА приблизилось к показателям интактной группы животных, в то время как введение ксимедона, хотя и способствовало увеличению числа растущих фолликулов и снижению процессов атрезии, но названные показатели к 180 суткам эксперимента не приближались к значениям интактного контроля.

Ключевые слова: двухсторонняя перевязка внутренних подвздошных артерий, яичник, мелатонин, ксимедон, фолликулогенез, лютеогенез, атрезия фолликулов.

The double bandaging of internal iliac arteries causes a disorder of folliculogenesis that expresses itself in quantity reduction of elementary and growing follicles and augmenting of processes of follicular atresia. The reduction of yellow bodies' number in cross sections of rat gonads indicates the disorder of luteogenesis to all terms of the experiment (180 days). Affected by intake of medications with antioxidative activity Xymedone and Melatonin the augmentaton of morphologically quantitative indicants in cross sections of rat gonads with the double bandaging of internal iliac arteries is present since the 30th day of the experiment. The study showed that Melatonin favours the better regenerative process of folliculogenesis and luteogenesis than Xymedone. Affected by intake of Melatonin the number of elementary and growing follicles and also yellow bodies after the double bandaging of internal iliac arteries closed in the indicants of the intact group of animals to the 180th day of the experiment, whereas in contrast intake of Xymedone favoured only the augmentaton of the number of growing follicles and reducing of atresia processes but not closing in the mentioned indicants of the intact control to the 180th day of the experiment.

Key words: the double bandaging of internal iliac arteries, gonad, Melatonin, Xymedon, folliculogenesis, luteogenesis, follicular atresia.

Введение. Двухсторонняя перевязка внутренних подвздошных артерий (ВПА) предлагается в последние годы как один из самых эффективных методов остановки массивных маточных кровотечений, позволяющий сохранять фертильную и менструальную функции репродуктивных органов [3, 6, 8, 10].

Однако, несмотря на сравнительно быстрое, согласно данным экспериментальных исследований, восстановление гемодинамики и структурных нарушений в репродуктивных органах [9], в отдаленном послеоперационном периоде у женщин, перенесших двухстороннюю перевязку ВПА, в ряде случаев наблюдается гормональная дисфункция, требующая медикаментозной коррекции [11].

В условии двухсторонней перевязки ВПА, благодаря включению коллатерального кровоснабжения, ишемия в репродуктивных органах носит кратковременный характер, вслед за которой происходит реперфузия с реоксигенацией ткани. Известно, что чередование ишемии и реперфузии с реоксигенацией в ткани, провоцирует развитие оксидативного стресса с образованием свободных радикалов, оказывающих повреждающее воздействие на ткань [2, 12].

Современные познания патогенетических аспектов свободнорадикального повреждения ткани позволяют использовать фармакологическую коррекцию структурно-функциональных нарушений в яичниках в условии двухсторонней перевязки ВПА и осуществлять их профилактику препаратами с антиоксидантным типом действия.

В доступной литературе нет данных по изучению и опыте использования названных препаратов при двухсторонней перевязке ВПА.

Перспективными в плане исследования представляются: гормон эпифиза - мелатонин и препарат пиримидинового ряда - ксимедон.

Доказана *in vitro* и *in vivo* высокая антиоксидантная активность названных препаратов: мелатонин обладает способностью принимать непосредственное участие в нейтрализации различных высокотоксичных свободных радикалов [1], а антиоксидантный эффект ксимедона выражен, по мнению исследователей, в мембраностабилизирующем действии [5]. Кроме того, в ряде работ показана способность мелатонина оказывать влияние на гипоталамо-гипофизарно-яичниковую систему в регуляции овариального цикла при развитии гормонального дисбаланса [4]. Ксимедон отличается высокой репаративной активностью, что позволяет использовать его в клинической практике при заживлении ран, ожогов, трофических язв и др. [5].

Цель исследования - дать сравнительную морфоколичественную оценку влияния мелатонина и ксимедона на изменение генеративного аппарата яичников крыс в условии двухсторонней перевязки ВПА.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на материале 168 нелинейных белых крысах-самках в возрасте 6-12 месяцев, массой 220-250 г.

Экспериментальная часть исследования включала 2 серии:

В первой серии эксперимента животным под уретановым наркозом (800 мг/кг внутривентрально) производилась двухсторонняя перевязка ВПА (n=144).

Во второй серии экспериментального исследования животным вводились лекарственные препараты ксимедон и мелатонин.

В связи с этим все экспериментальные животные были ранжированы на 4 группы.

В первую группу (n=24) были выделены интактные животные, которые служили контролем в исследовании.

Во вторую группу (n=48) вошли животные, которым после двухсторонней перевязки ВПА не вводились препараты. Эта группа животных была использована в качестве группы сравнения.

В третью группу (n=48) выделены животные, которым после двухсторонней перевязки ВПА в течение 30 суток ежедневно внутривентрально вводился ксимедон из расчета 25 мг/кг массы животного.

Четвертой группе животных (n=48) после двухсторонней перевязки ВПА в течение 3 месяцев с питьевой водой давали мелатонин из расчета 2 мг/л.

Эксперимент длился 180 суток. Крыс выводили из эксперимента на 3, 7, 14, 30, 90, 180 сутки после проведенной двухсторонней перевязки ВПА методом декапитации под уретановым наркозом в стадию диэструса. Для определения фазы эстрального цикла производили цитологическое исследование влагалищных мазков [3].

Материалом для исследования явились яичники крыс-самок.

Отпрепарированные яичники заливали в парафин. На серийных гистологических срезах толщиной 6—7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином с помощью окуляр-микрометра проводилась количественная оценка состояния генеративного аппарата яичников крыс. Подсчитывали число фолликулов и желтых тел. Все фолликулы были разделены на 3 группы: к первой группе относили примордиальные фолликулы – фолликулы с одним рядом плоских эпителиальных клеток и с одним рядом кубических эпителиальных клеток, во вторую группу были отнесены растущие фолликулы всех размеров, и в третью группу вошли все атретические фолликулы. Об атрезии судили по отсутствию митозов в клетках гранулезной оболочки, по выпадению гранулезы в полость фолликула, по отслойке этой оболочки от внутренней теки, появлению в ней очагов дегенерации, по исчезновению блестящей оболочки и по хроматолизу. Подсчет генеративных элементов производился на серийных срезах через каждые

Таблица.

Содержание генеративных элементов в срезах яичников крыс при двухсторонней перевязке ВПА и в условии фармакологической коррекции мелатонином и ксимедоном ($M \pm m$)

Генеративные элементы	Интактный контроль	Сроки эксперимента			
		14 сутки	30 сутки	90 сутки	180 сутки
Двухсторонняя перевязка ВПА					
ПФ	6,78±0,29	7,37±0,52	5,12±0,43*	3,47±0,69*	4,94±0,29*
РФ	7,32±0,48	6,64±0,43	4,25±0,47 *	3,65±0,67 *	4,98±0,44 *
АФ	4,34±0,27	4,89±0,22	6,12±0,08*	11,65±1,83*	8,35±0,56*
ЖТ	5,94±0,54	5,24±0,35	4,28±0,54*	3,06±0,48*	4,64±0,47*
Двухсторонняя перевязка ВПА+мелатонин					
ПФ	6,78±0,29	6,34±0,32	5,64±0,12	6,24±0,23#	6,69±0,34*#
РФ	7,32±0,48	6,85±0,76	5,48±0,19#	6,97±0,87#	7,74±0,87*#
АФ	4,34±0,27	4,74±0,43	5,58±0,34#	5,15±0,89#	4,75±0,78*#
ЖТ	5,94±0,54	5,32±0,31	4,45±0,65	4,94±0,56#	5,87±0,67*#
Двухсторонняя перевязка ВПА+ксимедон					
ПФ	6,78±0,29	6,38±0,65	5,22±0,65#	4,24±0,78#	5,45±0,64*#
РФ	7,32±0,48	6,78±0,43#	5,16±0,45#	5,43±0,54#	6,03±0,53*#
АФ	4,34±0,27	4,65±0,12	6,07±0,76	9,34±0,93#	6,34±0,23*#
ЖТ	5,94±0,54	5,55±0,39#	4,89±0,56#	4,23±0,39#	4,97±0,45*#

Примечание: * - при сравнении с животными интактной группы ($p < 0,05$); # - при сравнении с группой животных, не получавших препараты после двухсторонней перевязки ВПА ($p < 0,05$); ПФ-примордиальные фолликулы, РФ-растущие фолликулы, АФ-атретические фолликулы, ЖТ-желтые тела.

150-200 мкм ткани яичника в каждом пятом срезе.

Статистическая обработка материала выполнена с использованием прикладных программ: Microsoft Windows (Microsoft Office Excel 2007) с вычислением средних арифметических величин (M), стандартных ошибок средних (m) и t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При морфометрическом исследовании срезов яичников крыс установлено, что после перевязки ВПА у животных уже к 30 суткам наблюдения происходит постепенное уменьшение числа примордиальных фолликулов, достигая к 90 суткам эксперимента своего минимального значения - $3,47 \pm 0,69$ ($p < 0,05$), в то время как в интактном контроле оно составляет $6,78 \pm 0,29$. При этом обращает на себя внимание тот факт, что у крыс к 14 суткам после перевязки ВПА содержание примордиальных фолликулов в срезах яичников на 10,9% превышал таковое в контроле. В отдаленном послеоперационном периоде (180 суток) наблюдается тенденция к увеличению числа примордиальных фолликулов, однако, это число остается сниженным на 27,1% в сравнении с интактным контролем (табл.).

Похожая тенденция складывалась и в от-

ношении растущих фолликулов. Количество растущих фолликулов в срезах яичников крыс в 2 раза уменьшается к 90-м суткам эксперимента, что отражает наиболее выраженные нарушения фолликулогенеза яичников на данном сроке послеоперационного периода. Неполноценность фолликулогенеза сохранялась до 180 суток после двухсторонней перевязки ВПА, о чем свидетельствует сниженное на 31,9% в сравнении с интактным контролем число растущих фолликулов.

Наиболее отчетливо нарушение фолликулогенеза демонстрирует динамика изменения численной плотности желтых тел – конечного результата эффективного фолликулогенеза. В послеоперационном периоде после двухсторонней перевязки ВПА происходило прогрессирующее снижение этого показателя в сравнении с контролем: к 14-м суткам на 11,8%, к 30 -м суткам на 27,9%, что свидетельствует о «разорвавшейся» цепи фолликулогенеза в результате некроза и апоптоза клеток гранулезы в этот период. Минимальные значения численной плотности желтых тел на срезах яичников крыс с двухсторонней перевязкой ВПА были выявлены на сроке 90 суток наблюдения (на 48,5% ниже контрольного значения), что обусловлено сохраняющимися существенными нарушениями гормонально опосре-

дованного процесса трансформации фолликулов яичников. В эксперименте большинство желтых тел неправильной формы, находящихся в стадии инволюции, что указывает на снижение числа созревших и вышедших из фолликулов ооцитов. К 180 суткам послеоперационного периода количество желтых тел оставалось сниженным на 21,9% в сравнении с интактным контролем.

Другим критерием функционального состояния яичников является интенсивность процесса атрезии фолликулов. Нами установлено, что у животных после двухсторонней перевязки ВПА интенсивность процесса атрезии растущих фолликулов постепенно увеличивается с 30 суток эксперимента, при этом число атретических фолликулов к 90 суткам послеоперационного периода в срезах яичников достигало до $11,65 \pm 0,83$, в то время как в интактном контроле оно составило - $4,34 \pm 0,27$ ($p < 0,05$). К 180 суткам число атретических фолликулов было почти вдвое выше интактного контроля ($8,35 \pm 0,56$, $p < 0,05$). Атрезия проходила как по типу облитерирующей, так и по типу кистозной. Наличие кистозной атрезии свидетельствует о патологических сдвигах в гормональном статусе животных.

На фоне введения ксимедона и мелатонина после двухсторонней перевязки ВПА в срезах яичников белых крыс выявлялось достоверное увеличение числа примордиальных и растущих фолликулов с 30 суток послеоперационного периода. Сравнивая срезы яичников животных, получавших ксимедон и животных, получавших мелатонин после двухсторонней перевязки ВПА, получены результаты, позволяющие утверждать, что оба препарата достоверно оказывают положительное влияние на восстановление структурности яичников и способствуют улучшению процесса фолликуло- и лютеогенеза. Однако мелатонин в сравнении с ксимедоном оказывает более выраженное протективное действие на структуру яичников.

Наиболее показательна протективная активность препаратов прослеживается с 90 суток исследования: число первичных и растущих фолликулов в срезах яичников в сравнении со 2-ой группой экспериментальных животных при введении ксимедона увеличилось на 22,1% и 48,7% соответственно, а при введении мелатонина на 79,8% и 102% соответственно (табл.).

Показатели лютеогенеза в яичниках крыс, подвергшихся воздействию мелатонина после двухсторонней перевязки ВПА, к 180 суткам эксперимента приближались к таковым показателям интактного контроля, а на фоне введения ксимедона число желтых тел в срезах яичников на том же сроке эксперимента было сниженным на 16,3% в сравнении с интактным контролем.

Показатели снижения атрезии яичников животных, получавших ксимедон после двухсторонней перевязки ВПА, были менее информативны в сравнении с показателями животных, получавших мелатонин: число атретических фолликулов снизилось к 90 суткам эксперимента на фоне введения мелатонина на 55,8%, а на фоне введения ксимедона лишь на 19,8%. А к 180 суткам количество атретических фолликулов снизилось на 43,1% и 24,1% соответственно, в сравнении с 2-ой группой экспериментальных животных.

Таким образом, проведенное исследование показало, что при двухсторонней перевязке ВПА развивается нарушение фолликулогенеза и лютеогенеза, выражающееся снижением примордиальных, растущих фолликулов и желтых тел с одновременным увеличением числа атретических фолликулов. Увеличение числа примордиальных и растущих фолликулов и снижение активности атретических процессов в яичниках на фоне введения препаратов с антиоксидантной активностью - мелатонина и ксимедона подтверждает оксидативную природу повреждающего фактора при двухсторонней перевязке ВПА. Мелатонин проявляет наибольшую активность и способствует полному восстановлению фолликулогенеза и лютеогенеза к 180 суткам наблюдения, в то время, как ксимедон не показал подобные результаты. Это обусловлено, вероятно, участием мелатонина в регуляции биоритмов в организме животных и способностью оказывать влияние на гипоталамо-гипофизарно-яичниковую систему. Восстанавливая дисбаланс в гормональном статусе животных, мелатонин способствует восстановлению структурной организации генеративных элементов яичников.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Анисимов В.Н.. Старение женской репродуктивной системы и мелатонин /В.Н.Анисимов, И.А.Виноградова // СПб. Издательство «Система», 2008. -44 с.
2. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов /М.В.Биленко // М: Медицина, 1989. - 367с.
3. Бреслав И.Ю. Перевязка внутренних подвздошных артерий в лечении массивных акушерских кровотечений /И.Ю.Бреслав // Автореф.дис.. канд. мед.наук. М. 2009. -27 с.
4. Виноградова И.А. Световые режимы и овуляторная функция крыс в онтогенезе /И.А.Виноградова, И.В.Чернова//Росс. физиол.ж. им. И.М.Сеченова, 2007. - Т. 93, № 1. - С.90-98.
5. Измайлов С.Г. Ксимедон в клинической практике /С.Г. Измайлов, Г.А. Измайлов // Н.Новгород: Изд-во НГМА. – 2001. - 121с.
6. Ищенко А.А. Современные органосохраняющие

операции на матке при гипотонических кровотечениях в акушерстве / А.А.Ищенко // Автореф. дисс... канд. мед. наук. М. 2005. - 29 с.

7.Кабак Я.М. «Исследование полового цикла самок грызунов методом влажных мазков» /Я.М. Кабак // Практикум по эндокринологии. Изд-во Московского Университета, 1968.- с. 30-36.

8.Курцер М.А. Значение перевязки внутренних подвздошных артерий в лечении массивных акушерских кровотечений /М.А.Курцер, И.Ю. Бреслав// Акушерство и гинекология, 2008.- № 6. -С. 18-22.

9.Минеев К.П. Клинико-морфологические аспекты перевязки сосудов таза. /К.П. Минеев// Ульяновск: Симбирская книга, 1999. - 191 с.

10.Радзинский В. Е. Лечение гипотонических маточных кровотечений. Новая технология старого метода / В. Е.Радзинский, Я. Г.Жуковский, М. А. Оленева и др. // Акушерство и гинекология, 2007. - № 1. - С. 48- 50.

11. Трифонова Н.С. Современные методы терапии акушерских кровотечений. /Н.С.Трифопова, А.А. Ищенко // Акушерство и гинекология.,2008. - N 3. -С. 7-10.

12.Favie A. Oxidative stress in human diseases. /Favie A.// Ann. Pharm. Fr., 2006.- Vol. 4, № 6. -P.390-396.

REFERENCES:

1.Anisimov V.N., Starenie zhenskoy reproduktivnoy sistemy i melatonin. /V.N.Anisimov, I.A. Vinogradova // SPb.Izdatel'stvo «Sistema», 2008. -44 s.

2.Bilenko M.V. Ishemicheskie i reperfuzionnye povrezhdeniya organov. /M.V. Bilenko //M: Meditsina, 1989.- 367s.

3.Breslav I.YU. Perevyazka vnutrennikh podvzdoshnykh arterij v lechenii massivnykh akusherskikh krvotечenij. /I.YU. Breslav//Avtoref. dis.. kand.med.nauk. M. 2009.- 27 s.

4.Vinogradova I.A. Svetovye rezhimy i oulyatornaya funktsiya krysa v ontogeneze. /I.A.Vinogradova, I.V.Chernova // Ross. fiziol.zh. im. I.M.Sechenova. 2007.- t. 93.- №1.- S.90-98.

5.Izmajlov S.G. Ksimedon v klinicheskoy praktike . /S.G.Izmajlov, G.A. Izmajlov //N.Novgorod: Izd-vo NGMA. - 2001.

6. Ishhenko A. A. Sovremennye organosokhranyayushhie operatsii na matke pri gipotonicheskikh krvotечeniyakh v akusherstve. /A.A. Ishhenko // Avtoref. diss... kand. med. nauk. M. 2005,- 29 s.

7.Kabak YA.M. «Issledovanie polovogo tsikla samok gryzunov metodom vlagalishnykh mazkov» /YA.M.

Kabak // Praktikum po ehndokrinologii. Izd-vo Moskovskogo Universiteta, 1968.- S. 30-36.

8.Kurtser M.A. Znachenie perevyazki vnutrennikh podvzdoshnykh arterij v lechenii massivnykh akusherskikh krvotечenij. / M.A.Kurtser, I.YU. Breslav// Akusherstvo i ginekologiya, 2008.- № 6.- S.18-22.

9.Mineev K.P. Kliniko-morfologicheskie aspekty perevyazki sosudov taza. /K.P.Mineev//Ul'yanovsk: Simbirskaya kniga, 1999. - 191 s.

10.Radzinskij V. E. Lechenie gipotonicheskikh matochnikh krvotечenij Novaya tehnologiya starogo metoda / V. E.Radzinskij, YA. G.ZHukovskij, M. A. Oleneva i dr. //Akusherstvo i ginekologiya, 2007. - № 1. -S. 48-50. 11.

11.Trifonova N.S. Sovremennye metody terapii akusherskikh krvotечenij. /S.Trifonova, A.A. Ishhenko // Akusherstvo i ginekologiya. - 2008. - N 3. -S. 7-10.

12.Favie A. Oxidative stress in human diseases. /A.Favie // Ann. Pharm. Fr., 2006.- Vol. 4, № 6. -P.390-396.

Авторская справка:

1. Чаиркин Иван Николаевич, зав.кафедрой нормальной анатомии, профессор ФГБУО ВПО «Мордовский госуниверситет им.Н.П.Огарева». 430027, г. Саранск, ул.Комарова, д. 15, кв. 43. Тел. 89271727213, E-mail: chairkin@rambler.ru.

2. Морозов Валерий Евгеньевич, соискатель кафедры нормальной анатомии ФГБУО ВПО «Мордовский госуниверситет им.Н.П.Огарева». 443125, г. Саратов, ул.Силина д. 9, кв.59, E-mail: morozov.morozoff@yandex.ru

3. Чаиркина Наталья Викторовна доцент кафедры патологии ФГБУО ВПО «Мордовский госуниверситет им.Н.П.Огарева». 430027, г. Саранск, ул.Комарова, д. 15, кв. 43. Тел. 89179984396/

4. Маколова Юлия Ивановна, врач-терапевт МУЗ «Городская поликлиника №8». 430032, г. Саранск, ул. Попова д.64Г, корп.2, кв.40. Тел.89176926313.

5. Паршин А.А. ассистент кафедры нормальной анатомии ФГБУО ВПО «Мордовский госуниверситет им.Н.П.Огарева».430032, г. Саранск, ул.Ворошилова д.2, кв.435.

6. Мишечкин М.М. ассистент кафедры нормальной анатомии ФГБУО ВПО «Мордовский госуниверситет им.Н.П.Огарева», 430000, г. Саранск, ул. Сушинского д. 36, корп. 2, кв.12.

7. Моисеева Т.В. кандидат медицинских наук, доцент НОУ ВПО Медицинский институт «Реавиз». г. Самара, Чапаевская 227, 44301.