

На правах рукописи

ТКАЧУК Олеся Константиновна

**СТРУКТУРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДВЗДОШНЫХ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ НАРУШЕНИИ ОТТОКА ИЗ
ПОЛОСТИ МАТКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Майбородин Игорь Валентинович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Склянов Юрий Иванович**

(Новосибирский государственный медицинский университет, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии педиатрического факультета)

доктор медицинских наук, профессор **Горчаков Владимир Николаевич**

(НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, заведующий лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита диссертации состоится "_____" _____ 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52)

Автореферат разослан "_____" _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На сегодняшний день воспалительные заболевания женских половых органов и, как их следствие, спасчный процесс, приводят к нарушениям репродуктивной функции у женщин. Наиболее актуальным в этом плане является бесплодие.

Впервые сообщения о гидрометре в научной медицинской литературе появились в начале XIX века. Был приведен случай гидрометры, являющейся причиной сухой гангрены [Thomson A.T., 1827]. После этого изредка публиковались данные о спонтанных случаях гидрометры у женщин [Wilson H.H., 1917; Langreder W., Vierneisel B., 1955] и домашних животных [Brooks E.I., 1948; Homma S., Sugawa Y., 1968; Fabian G., 1971].

Гидрометра и псевдобеременность характеризуются накоплением асептической жидкости в полости матки и персистенцией желтого тела. Часто встречаемость гидрометры растет по мере увеличения возраста животных [Waldow D. et al., 1999; Reitzenstein von M. et al., 2000; Srivastava K.K. et al., 2001; Batista M. et al., 2001; Pretzer S.D. et al., 2008; Tranquillo G.G. et al., 2009].

В качестве возможных причин накопления жидкости в полости матки рассматривают врожденные дефекты развития, такие как двурогая матка [Tarvidel-Raimondeau P. et al., 1988], сегментарная аплазия матки [Webb P., 1985; Batista M. et al., 2006; Batista-Arteaga M. et al., 2007], в том числе и маточных рогов [Oh K.S. et al., 2005; Chang J. et al., 2008], перекручивание органа (Hobbs B.A., Parker R.F., 1990), дисплазия шейки матки [Wancket L.M. et al., 2008], патология эстрогеновых рецепторов [Payan-Carreira R. et al., 2006], гермафродитизм и псевдогермафродитизм [McIntyre A., Perle la K.M., 2007; Matsuu A. et al., 2009].

Гидрометра и гидрометропорея иногда являются симптомом рака эндометрия [Daw E., 1969], аденокарциномы яичника [Memon M.A. et al., 1995] и рака шейки матки [Sawada M., Arai Y., 2007; Takeuchi K. et al., 2008]. У 9-месячной девочки описан случай гидрометры, развившейся в результате опухоли вагинального эндодермального синуса (желточного мешка) и обструкции влагалища [Wani N.A. et al., 2010].

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что в доступной литературе имеется очень мало данных о моделировании гидрометры и изменениях тканей матки при данной патологии, а результаты исследования регионарных лимфатических узлов при этом состоянии полностью отсутствуют. Вместе с этим, полное изучение особенностей

этиопатогенеза при развитии спаечного процесса и синехий в полости матки, приводящих к гидрометре, позволит обосновать новые направления ее лечения и профилактики.

Цель исследования. Изучить структурно-клеточные изменения подвздошных лимфатических узлов при нарушении оттока из полости матки в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Создать экспериментальную модель нарушения оттока из полости матки на крысах.

2. Методами световой микроскопии исследовать структурно-клеточные изменения подвздошных лимфатических узлов в ранние сроки при нарушении оттока из полости матки в эксперименте.

3. Установить отдаленные реакции регионарных лимфатических узлов при гидрометре у крыс.

Научная новизна. Впервые создана экспериментальная модель сегментарной атрофии матки у крыс.

Впервые проведено сравнительное исследование структурной организации регионарных к матке подвздошных лимфатических узлов крыс в различные сроки после нарушения оттока из полости матки.

Впервые обнаружено, что в ранние сроки после моделирования гидрометры в регионарных к матке лимфатических узлах происходит гипертрофия фолликулов без герминативных центров и с центрами размножения, в различных структурных отделах указанных органов на первый план выходят увеличение митотической активности, уменьшение численности лимфоцитов и возрастание числа иммуно- и плазмобластов, повышенное содержание клеток с признаками деструктивных изменений в ядре и цитоплазме.

Впервые продемонстрировано, что через 4-5 месяцев после лигирования маточных рогов изменения в подвздошных лимфатических узлах обусловлены нарушениями лимфотока и заключаются в склеротической трансформации коркового и мозгового вещества органов, сужении коркового плато и паракортикальной зоны, уменьшении числа и размеров лимфоидных фолликулов, резком снижении количества иммуно- и плазмобластов, супрессии митотической активности, высокой численности тканевых базофилов, клеточных элементов стромы, макрофагов и клеток с явлениями деструкции.

Теоретическое и практическое значение работы. Получены новые

знания об особенностях структурной перестройки подвздошных лимфатических узлов крыс в условиях нарушенного оттока из полости матки. Степень изменений регионарных лимфатических узлов при нарушении оттока из полости матки необходимо учитывать при выборе методов лечения и определении прогноза заболевания. Любое проводимое лечение (как консервативное, так и хирургическое) при патологии матки может улучшить лимфоток, но не приводит к обратному развитию соединительной ткани в регионарных лимфатических узлах.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Перевязка маточных рогов в эксперименте на крысах приводит к атрофии эндометрия и образованию синехий.

2. В ранние сроки после моделирования гидрометры в регионарных к матке (подвздошных) лимфатических узлах происходит гипертрофия фолликулов без герминативных центров и с центрами размножения, в различных структурных отделах указанных органов на первый план выходят увеличение митотической активности, уменьшение численности лимфоцитов и возрастание числа иммуно- и плазмобластов.

3. Через 4-5 месяцев после нарушения оттока из полости матки изменения в регионарных лимфатических узлах заключаются в развитии соединительной ткани во всех структурах.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертации доложены на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии», посвященной 20-летию Кузбасского кардиологического центра (Кемерово, 2010), на VII международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2010), на межлабораторной конференции сотрудников Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Новосибирского государственного медицинского университета.

Внедрение результатов исследования в практику. Полученные результаты внедрены в научную работу Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 3 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России для публикации основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, 2 глав с описанием полученных собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, иллюстрирована 44 многокомпонентными комбинированными рисунками. Список литературы включает 300 источников литературы (121 отечественный и 179 иностранных). Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным комитетом по медицинской этике Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (протокол № 23 от 23.12.2010). Работа основана на результатах морфологического исследования подвздошных лимфатических узлов в различные сроки после нарушения оттока из полости матки (гидрометры) в эксперименте у крыс-самок инбредной линии Wag возрастом 6 месяцев и весом 180-200 г (на начало наблюдения).

Моделирование нарушения оттока из полости матки. Под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением правил асептики и антисептики выполняли послойную срединную лапаротомию. Выделяли матку, под каждый рог в медиальной трети подводили кетгутовую лигатуру и перевязывали оба рога матки в указанном отделе. Послойно ушивали переднюю брюшную стенку (париетальная брюшина, мышцы и апоневроз, кожа с подкожно-жировой клетчаткой) непрерывными однорядными швами. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев после создания гидрометры. На каждую точку эксперимента было использовано не менее 6 животных, всего было использовано 62 крысы.

Методы морфологического анализа. Подвздошные лимфатические узлы фиксировали в 4 % растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов, обезживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван Гизону [Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996].

Для исследования структурной организации подвздошных

лимфатических узлов и клеточных элементов в их зонах применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. При использовании объектива с увеличением $\times 5$ конечная площадь тестового квадрата была равна 16900 мкм² (сторона квадрата 130 мкм), при подсчете цитогаммы клеток (применение объектива с увеличением $\times 40$) – 256 мкм² (сторона квадрата 16 мкм) [Майбородин И.В. и др., 2009, 2010, 2011]. Статистическую обработку результатов проводили на прикладной статистической программе MS Excel (Microsoft, USA), определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различия между средними считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гидрометра в различное время после нарушения оттока из полости матки в эксперименте

Через 1 месяц имело место развитие умеренного спаечного процесса в области малого таза без вовлечения верхних этажей брюшной полости. Обнаружены выраженные изменения со стороны маточных рогов, проявляющиеся наличием гидрометры выше места перевязки до истмической части маточной трубы, видимо, вследствие отсутствия оттока в трубу и из нее в брюшную полость. Характер содержимого в просвете рогов матки нами был расценен как прозрачный, серозный, без наличия гнойных элементов.

При изучении с помощью увеличения в 6-10 раз структуры маточных рогов было обнаружено формирование синехий в месте перевязки, гипертрофия и растяжение стенки матки выше места лигирования, формирование полноценной непроходимости. В зоне сужения просвета найдена атрофия всех оболочек матки.

То есть в данном случае в экспериментальных условиях получена модель гидрометры, соответствующая патологии, связанной с недоразвитием или аплазией сегментов матки [Webb P., 1985; Batista M. et al., 2006; Batista-Arteaga M. et al., 2007] или маточных труб [Oh K.S. et al., 2005; Chang J. et al., 2008], и которая служит одной из причин этого заболевания у женщин и животных.

Спустя 2 месяца при вскрытии брюшной полости обращало на себя внимание еще более выраженное расширение маточных рогов и прогрессирующее увеличение объема серозной жидкости в их просвете, то есть явления гидрометры нарастали. Маточные рога представляли собой кистозно

расширенные образования с тонкими стенками, сквозь которые просвечивало прозрачное содержимое серозного характера.

На все последующие сроки (3, 4 и 5 месяцев после хирургического вмешательства) явления гидрометры прогрессировали, и маточные рога все более расширялись выше места перевязки, по сравнению с каждым предыдущим сроком. К концу наблюдения кистозно измененные рога матки занимали собой не только область малого таза, а практически всю брюшную полость.

Во всех случаях в этих группах были найдены полностью сформированные синехии в просвете маточных рогов с формированием атрофии всех тканей матки в месте лигирования.

Кроме того, на все сроки, даже через 5 месяцев, у отдельных крыс в месте перевязки маточных рогов присутствовал инкапсулированный шовный материал (кетгут), несмотря на данные литературы о сроках абсорбции кетгута в течение 15-20 дней у человека, на что уже обращали внимание другие исследователи [Майбородин И.В. и др., 2008, 2010б].

У крысы маточный рог представляет собой тонкую трубку, один конец которой сообщается с полостью тела матки, а другой – с маточной трубой, открывающейся в полость брюшины у поверхности яичника. Согласно литературным данным, в норме у млекопитающих происходит отток содержимого маточных труб в брюшную полость с последующим всасыванием брюшиной [Сахаров П.П. и др., 1952; Лейн-Петтер У., 1964; Западнюк И.П. и др., 1974; Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л., 2001].

В нашем эксперименте не обнаружено оттока жидкостного содержимого маточных рогов в трубы и далее в брюшную полость, наоборот, во всех случаях наблюдали выраженную гидрометру.

В истмической части маточной трубы расположен клапан, способствующий развитию беременности в маточных рогах и препятствующий выходу оплодотворенной яйцеклетки из матки. Также нельзя исключить нарушения оттока содержимого трубы в брюшную полость из-за расположения подобных клапанов в ампулярной части трубы. Не исключено, что данные о возможности развития перитонита восходящим путем при гинекологической патологии сильно преувеличены.

Реакция подвздошных лимфатических узлов крыс на нарушение оттока из полости матки

Изменения структуры лимфатических узлов. Объемная плотность

капсулы подвздошных лимфатических узлов стала больше контрольной в 2,1 раза через 4 и 5 месяцев после нарушения оттока из полости матки в эксперименте.

Прослойки соединительной ткани в корковом веществе лимфатических узлов к 4 и 5 месяцам после операции стали шире в 6,2 и 6,4 раза, соответственно, чем в контроле. Относительная площадь соединительной ткани в мозговом веществе лимфатических узлов через 4 и 5 месяцев была больше в 5,3 и 5,6 раза, соответственно, относительно исходного уровня.

Видимо, при экспериментальном нарушении оттока из полости матки через перевязывание труб нарушается и лимфоотток, так как и лимфатические сосуды, проходящие в стенке маточной трубы, попадают в лигатуру.

По данным Ю.И. Бородина с соавт. [1982, 1986, 1987а, 1987б, 1987в, 1988, 1989, 1990а, 1990б, 1990в, 1991а, 1991б, 1992а, 1992б, 1999] и Н.А. Складной с соавт. [1987], отток лимфы от тела матки крыс осуществляется в каудальные лимфатические узлы, а при их отсутствии или блокаде – в подвздошные. От медиальной и средней части маточных рогов лимфа также направляется в подвздошные лимфатические узлы, от латеральной части – в почечные. Некоторая часть лимфы может перераспределяться в контралатеральные узлы.

В связи с тем, что при моделировании гидрометры была перевязана медиальная часть маточных рогов, можно заключить о наиболее выраженном нарушении лимфотока от матки в направлении подвздошных лимфатических узлов. Таким образом, объем лимфы, притекающей к лимфатическим узлам в результате экспериментального моделирования гидрометры, сокращается.

Скорее всего, утолщение капсулы и расширение соединительнотканых прослоек в корковом и мозговом веществе лимфатических узлов через 4 и 5 месяцев после операции обусловлено именно резким сокращением лимфопритока, так как, согласно литературным данным, лимфатические узлы реагируют на уменьшение пассажа лимфы развитием соединительной ткани во всех своих структурах [Rada I.O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Browne N.L., 1986; Майбородин И.В. и др., 1998, 2001, 2003б; Бородин Ю.И. и др., 2000].

Подвздошные лимфатические узлы собирают лимфу не только от матки, но и от некоторых других органов и тканей малого таза [Сапин М.Р. и др., 1978; Сапин М.Р., Борзяк Э.И., 1982], видимо, поэтому развитие склероза происходит не сразу, не в первые сроки наблюдения, а только к окончанию эксперимента: к

4 и 5 месяцам.

Корковое плато лимфатических узлов возросло к 2 месяцам на 49 %, но на 4 и 5 месяцах было статистически достоверно меньше на 35,4 % и 53 %, чем в контроле.

Любое хирургическое вмешательство сопровождается повреждением тканей. Тканевой детрит даже в асептических условиях обладает антигенными свойствами. Видимо, недостоверное расширение коркового плато на 1 и 2 месяцах после перевязки маточных труб обусловлено такой антигенной стимуляцией из места операции.

Скорее всего, поступление антигенов (из собственных поврежденных тканей) из места операции приводит к пролиферации В-лимфоцитов коркового плато, за счет этого, видимо, и расширяется эта зона. Кроме пролиферации в клетках коркового плато стимулируется дифференцировка. Активно делящиеся и созревающие лимфоциты формируют лимфоидные фолликулы без герминативных центров. Далее в таких узелках, по мере дифференцировки клеток, образуются светлые центры.

Однако, объем лимфы, притекающей к лимфатическим узлам, уменьшен, соответственно и уменьшен объем антигенов, поступающих в эти органы из региона лимфосбора, по-видимому, это и служит основной причиной сокращения объема коркового плато к окончанию времени наблюдения.

Относительная площадь паракортикальной зоны стала меньше к 4 и 5 месяцам на 38,4 % и 41,5 %, соответственно, по сравнению с контролем.

В паракортексе содержатся, в основном, Т-зависимые клетки, которые также являются иммунокомпетентными. В связи с этим, причины, приводящие к сужению коркового плато, способствуют и гипотрофии Т-зоны лимфатических узлов. Это – уменьшение объема афферентной лимфы после перевязки маточных труб и, соответственно, резкое уменьшение антигенной стимуляции. Не исключено, что в результате уменьшения объема антигенов, поступающих в лимфатический узел, Т-клетки мигрируют для функционирования в пораженных тканях или в другие иммунокомпетентные органы [Baekkevold E.S. et al., 2003; Nagamatsu H. et al., 2004; Uhlig H.H. et al., 2004; Azzali G. et al., 2007], например, другие лимфатические узлы.

Объемная плотность лимфоидных фолликулов без центров размножения сначала недостоверно возросла и в связи с этим была меньше, чем на 1 месяце, на 85,1 %, 58,3 % и 65,3 %, соответственно, через 3, 4 и 5 месяцев после операции.

Фолликулы с герминативными центрами спустя 5 месяцев были меньше на 63,4 % относительно состояния через 1 и 2 месяца.

Снижение антигенной нагрузки на лимфатические узлы в связи с уменьшением объема лимфы способствует постепенному уменьшению относительной площади фолликулов и с центрами размножения и без герминативных центров на срезе органов. То есть уменьшаются размеры структур, где высока митотическая активность и которые непосредственно связаны с поступлением антигенов. После активации антигеном незрелых В-клеток коркового плато эти клетки начинают делиться и сначала формируют узелки без центров размножения. По мере дифференцировки клеток в центре таких фолликулов там формируется светлый центр, а в мантийной зоне продолжается быстрая пролиферация активированных В-клеток [Бородин Ю.И., Григорьев В.Н., 1986]. Уменьшение антигенной стимуляции обуславливает и уменьшение количества и размеров новых фолликулов без герминативных центров, а через некоторое время – и фолликулов с центрами.

Объемная плотность мягкотных тяжей постепенно возрастала и через 4 и 5 месяцев была больше на 48,1 % и 48,7 %, соответственно, относительно состояния в контроле.

Клеточный состав мягкотных тяжей, в основном, представлен зрелыми плазматическими клетками, которые могли сформироваться в достаточно отдаленное время, и их численность не уменьшается даже при прекращении антигенной стимуляции [Бородин Ю.И., Григорьев В.Н., 1986]. При сокращении объемной плотности практически всех структур лимфоидной паренхимы коркового вещества размер мягкотных тяжей остается более-менее постоянным, но при снижении процента других структур относительная площадь тяжей возрастает даже при неизменном абсолютном размере.

Процент мозговых синусов на срезе лимфатических узлов недостоверно уменьшился к 1 и 2 месяцам и поэтому на 4 месяце был уже статистически достоверно больше на 44,5 %, чем спустя 1 месяц. Через 5 месяцев величина значения этого показателя была больше на 51,8 % и 72,5 %, соответственно, относительно состояния на 1 и 2 месяцах.

Размер мозговых синусов напрямую зависит от пассажа лимфы через лимфатические узлы. Поэтому в первые сроки после перевязки маточных труб размер этих структур уменьшился, а потом начал постепенно увеличиваться, по-видимому, или из-за восстановления оттока от тканей матки (развитие коллатералей), или за счет лимфы от других органов и тканей малого таза.

Изменения цитограммы коркового плато. Процент лимфоцитов в корковом плато лимфатических узлов через 1, 2, 3 и 4 месяца после начала эксперимента был статистически достоверно меньше контрольного на 13,2 %, 13,4 %, 11,2 % и 10,6 %, соответственно.

Выше мы уже отмечали сужение коркового плато в поздние сроки после операции. Возможно, что это сужение связано с уменьшением численности лимфоцитов, которые составляют основную массу клеток в этой зоне лимфатических узлов.

Учитывая динамику изменений объемной плотности лимфоидных фолликулов (сначала расширение, а потом, к окончанию эксперимента, резкое сужение), можно предположить, что, скорее всего, на 1 и 2 месяцах после операции уменьшение численности лимфоцитов связано с их активной пролиферацией, дифференцировкой и быстрым формированием фолликулов. К окончанию времени наблюдения уменьшение количества лимфоцитов наиболее вероятно может быть обусловлено снижением антигенной стимуляции в связи с уменьшением объема лимфы, притекающей к лимфатическим узлам от матки после перевязки ее труб. В таких условиях незрелые В-лимфоциты мигрируют в другие органы для осуществления своих функций [Brandtzaeg P., 1997; Farstad I.N. et al., 2000; Peng H.J. et al., 2000; O'Hanlon T.P. et al., 2000].

Относительное количество ретикулярных клеток постепенно возрастало и на 4 и 5 месяцах было больше на 32,2 % и 35,6 %, соответственно, чем в контроле.

Постепенное и достоверное возрастание численности ретикулярных клеток (клеточных элементов стромы) в корковом плато, видимо, в первую очередь обусловлено постепенным развитием соединительной ткани в корковом веществе лимфатических узлов, что, в свою очередь, зависит от прекращения или уменьшения лимфотока [Rada I.O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Browse N.L., 1986; Майбородин И.В. и др., 1998, 2001, 2003б; Бородин Ю.И. и др., 2000].

Процент макрофагов на 3 и 5 месяцах был на 71,7 % и 84,6 %, соответственно, больше исходного.

Содержание макрофагов в данном случае может возрасть вследствие 2 причин: во-первых, из-за необходимости лизиса антигенных веществ и детрита, поступающих из места хирургического вмешательства, но это может быть в ранние сроки после операции; во-вторых, число макрофагов может возрасть в связи с активным синтезом соединительной ткани, неотъемлемым

компонентом которой они являются, но это может служить объяснением увеличению количества этих клеток в конце эксперимента. Скорее всего, имеет место сочетание обеих этих причин.

Относительное содержание делящихся клеток в корковом плато было больше контроля на 1 и 2 месяцах в 2,4 и 2,5 раза, соответственно. Потом этот показатель постепенно снижался и на 4 месяце был достоверно меньше в 2,5 раза, чем на 1 и 2 месяцах, а к 5 месяцу стал ниже в 3,4 и 3,5 раза, соответственно, и также относительно состояния через 1 и 2 месяца.

Изменения содержания делящихся клеток (резкий подъем через 1 и 2 месяца и далее такое же резкое падение ниже исходного уровня), по-видимому, связано с динамикой поступления антигенных веществ вместе с лимфой из региона лимфосбора.

В ранние сроки приток антигенных веществ возрастает вследствие репарации поврежденных при операции тканей и, соответственно, возрастает пролиферативная активность (число фигур митозов), что, в свою очередь, приводит к уменьшению численности лимфоцитов и увеличению объемной плотности лимфоидных фолликулов.

К окончанию наблюдения объем антигенных веществ падает вместе с сокращением объема афферентной лимфы и, также соответственно, падает уровень пролиферации в корковом плато.

Процентное число клеточных элементов с признаками деструктивных изменений через 1, 2, 3 и 4 месяца превосходило контрольный уровень в 3,5, 3,4, 4,2 и 3,8 раза, соответственно. Точно так же менялось и абсолютное содержание клеток с деструкцией ядра или цитоплазмы, но из-за большого значения ошибки средних величин оно только спустя 1 и 3 месяца было больше в 3,1 и 3,8 раза, соответственно, чем в контроле.

В данном случае мы связываем увеличение численности клеток с признаками деструкции, во-первых, с активацией собственных лизосом в результате возрастания митотической активности и стимуляции дифференцировки лимфоцитов, иммуно- и плазмобластов. При увеличении количества делящихся клеток возрастает численность и объектов, в которых при митозе произошли какие-то ошибки (нарушения расхождения хромосом и др.). В этих клетках, ввиду их неполноценности, запускаются процессы апоптоза или, ввиду антигенности дефектных клеток, они лизируются ферментами фагоцитов. В том и другом случае в таких клетках можно наблюдать кариопикноз (уплотнение ядра), кариорексис (распад ядра),

вакуолизацию ядра и цитоплазмы и другие признаки деструкции; во-вторых, также не исключено, что на процессе увеличения числа клеток с необратимыми изменениями сказывается и возрастание прямого воздействия антигенных и токсических веществ из места воспалительной реакции.

Изменения цитограммы паракортикальной зоны. Процент лимфоцитов в паракортикальной зоне подвздошных лимфатических узлов через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев после операции был статистически достоверно меньше на 16,2 %, 22,2 %, 25 %, 30,2 % и 33,6 %, соответственно, чем в контроле.

Наиболее вероятно, что на ранние сроки после операции уменьшение численности лимфоцитов в паракортексе (Т-зависимой зоне) связано с миграцией активированных Т-клеток к месту хирургического вмешательства, к детриту и антигенным веществам [Nagamatsu H. et al., 2004; Uhlig H.H. et al., 2004; Azzali G. et al., 2007].

Тогда как в поздние сроки уменьшение количества лимфоцитов обусловлено снижением объема лимфы, поступающей в лимфатические узлы (снижение объема антигенов ниже обычного уровня) и склеротизацией коркового вещества этих органов.

Относительное содержание иммуно- и плазмобластов через 1 и 2 месяца было больше в 2,1 и 2,2 раза, соответственно, чем в контроле.

Иммуно- и плазмобласты, находящиеся в паракортексе, мигрируют туда из коркового плато. В связи с этим, видимо, подъем числа этих клеток на срок в 1-2 месяца связан с антигенной стимуляцией иммунокомпетентных клеток коркового плато после хирургического вмешательства (поступление детрита и антигенов в лимфатические узлы).

Процент ретикулярных клеток спустя 4 и 5 месяцев был статистически достоверно выше на 47,1 % и 52,9 %, соответственно, чем в контроле.

Скорее всего, в данном случае также увеличение содержания клеток стромы в поздние сроки после операции обусловлено постепенным развитием соединительнотканых прослоек при склеротизации коркового вещества в результате резкого сокращения притока лимфы к лимфатическим узлам [Rada I.O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Browse N.L., 1986; Майбородин И.В. и др., 1998, 2001, 2003б; Бородин Ю.И. и др., 2000] после перевязки маточных труб в эксперименте.

Процентное содержание макрофагов у интактных животных было меньше в 2,3, 2,5 и 2,7 раза, соответственно, чем через 3, 4 и 5 месяцев после хирургического вмешательства.

Увеличение количества макрофагов, видимо, обусловлено как необходимостью лизиса детрита и антигенов, поступающих в лимфатические узлы из места хирургического вмешательства, так и с участием в обмене коллагена при активном синтезе соединительной ткани в результате сокращения пассажа лимфы.

Практически во всех группах животных у отдельных особей в цитограмме паракортекса присутствовали тканевые базофилы, но только через 5 месяцев после операции эти клетки присутствовали в данной зоне лимфатических узлов всех крыс. На этот срок тканевых базофилов стало больше в 3,7 раза, относительно контроля.

Тканевые базофилы (тучные клетки) являются неотъемлемой частью соединительной ткани. Секретируемые тучными клетками вещества, в частности гистамин, увеличивают сосудистую проницаемость, и, следовательно, в тканях возрастает количество фибрина. Однако, фибрин, находящийся в тканях, стимулирует пролиферацию фибробластов, синтез соединительной ткани и образование сосудов в ней [Dvorak H.F. et al., 1986; Freitas I. et al., 1991; Haroon Z.A. et al., 1999].

Большинство цитокинов тучных клеток вызывает пролиферацию и созревание фибробластов и образование соединительной ткани [Roche W.R., 1985; Joseph-Silverstein J., Rifkin D.B., 1987; Michel L. et al., 1992; Ruger B. et al., 1994], что является очень важным для понимания процессов заживления ран, развития острого и хронического воспаления, аллергии, склероза, фиброза и т.п. [Crivellato E. et al., 2004; Somasundaram P. et al., 2005; Deliargyris E.N. et al., 2005; Crivellato E., Ribatti D., 2005; Chetta A. et al., 2005; Frangogiannis N.G., Entman M.L., 2006].

Скорее всего, появление и рост численности тканевых базофилов в конце эксперимента связан с прогрессированием в лимфатических узлах склеротических процессов, вызванных длительным нарушением лимфотока.

Относительное содержание клеток с признаками деструктивных изменений через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев было выше в 2,4, 2,7, 2,8, 2,7 и 2,5 раза, соответственно, чем в контроле. Абсолютное число клеток с деструктивными изменениями спустя 1, 3 и 4 месяца было больше в 2,5, 2,6 и 2,6 раза, также соответственно, по сравнению с исходным уровнем.

К постоянному возрастанию численности клеточных элементов с явлениями деструктивных изменений, скорее всего, приводит поступление антигенных и токсических веществ (сначала операция, далее гипоксия тканей и

сдавление жидкостью в полости маточных рогов) из региона лимфосбора и прямое действие этих веществ на клетки паракортикальной зоны.

Также нельзя исключить возможность появления нежизнеспособных клеточных элементов в лимфатических узлах при развитии соединительной ткани и замещении ей нормальных структур и клеток лимфоидной паренхимы: инволюция в результате постепенного замещения и некроз в результате гипоксии, когда соединительнотканые прослойки пережимают сосуды или происходит склеротизация сосудистых стенок.

Изменения цитограммы лимфоидных фолликулов без герминативных центров. Процент лимфоцитов в лимфоидных фолликулах без центров размножения на 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев был статистически достоверно меньше на 13,7 %, 16,5 %, 16%, 13,6% и 13,9%, соответственно, чем в контроле.

После попадания антигенов в лимфатический узел активируются недифференцированные В-лимфоциты и начинают делиться. Множество быстро пролиферирующих клеток с небольшим объемом цитоплазмы и темным ядром с конденсированным хроматином формируют в корковом плато фолликул без герминативного центра. Постепенно пролиферативный потенциал лимфоцитов истощается и этих клеток в узелке становится меньше. Уменьшению митотической активности В-лимфоцитов способствует и снижение антигенной стимуляции в конце наблюдения из-за сокращения лимфопритока в узел и вследствие постепенной склеротической трансформации коркового вещества.

Относительное содержание иммуно- и плазмобластов через 1 и 2 месяца было больше в 2,2 раза, чем в контроле. Численная плотность бластов спустя 1 и 2 месяца была больше в 2,3 и 2,2 раза, соответственно, относительно исходного уровня.

Постепенно, по мере расширения узелка без центра размножения, в нем лимфоциты начинают дифференцировку и появляются иммуно- и плазмобласты. Резкий подъем численности бластов на 1 и 2 месяцах после операции, по-видимому, обусловлен антигенной стимуляцией В-клеток коркового плато из места хирургического вмешательства. По мере регенерации тканей в месте операции и уменьшения притока лимфы вследствие перевязки маточных труб антигенная стимуляция опускается ниже исходного уровня и также уменьшается число незрелых клеток в данных узелках.

Относительное количество макрофагов у интактных животных было меньше в 2,6, 3,0, 2,6 и 2,7 раза, соответственно, чем через 2, 3, 4 и 5 месяцев.

Абсолютное число макрофагов также через 2, 3, 4, и 5 месяцев было выше в 2,7, 3,0, 2,5 и 2,5 раза, также соответственно, и также относительно контроля.

Численность макрофагов в данных структурах, видимо, возросла как в связи с прямым действием антигенных и токсических веществ, поступающих из места операции (первые сроки после операции), так и с постепенным развитием соединительной ткани в корковом веществе лимфатических узлов вследствие уменьшения притока лимфы [Rada I.O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Browne N.L., 1986; Майбородин И.В. и др., 1998, 2001, 2003б; Бородин Ю.И. и др., 2000].

Процент митозов на 3, 4 и 5 месяцах был меньше в 2,6, 2,3 и 2,1 раза, соответственно, относительно состояния на 1 месяце. Число фигур митозов на 10^5 мкм² площади среза фолликула также через 1 месяц было выше в 2,7, 2,6 и 2,3 раза, также соответственно, и также чем спустя 3, 4 и 5 месяцев.

На 1 месяце подъем митотической активности, скорее всего, зависит от попадания антигенов из места операции в лимфатические узлы, затем, в связи с нарушениями лимфотока, приток антигенов резко снижается и параллельно уменьшается митотическая активность, пусть недостоверно, но становится даже меньше контроля и достоверно – относительно состояния на 1 месяце.

Относительное содержание клеток с признаками деструктивных изменений через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев было выше в 3,9, 4,9, 5,1, 4,7 и 4,2 раза, соответственно, по сравнению с интактным уровнем. Абсолютное число клеток с деструктивными изменениями спустя 1, 2, 3 и 5 месяцев было больше в 4,1, 5,1, 5,0 и 4 раза, соответственно, относительно контроля.

Более подробно возможные причины постоянного увеличения численности деструктивных клеток были рассмотрены выше (сначала это – поступление антигенов и токсинов из места хирургического вмешательства, затем – гипоксия тканей в регионе лимфосбора и развитие соединительной ткани в лимфатических узлах).

Изменения цитограммы центров размножения лимфоидных фолликулов. В герминативных центрах лимфоидных фолликулов с центрами размножения процент лимфоцитов на 1, 2, 3, 4 и 5 месяцах был статистически достоверно меньше на 36,4 %, 38,7 %, 40,7 %, 26 % и 22 %, соответственно, чем в контроле.

Дифференцировка В-клеток происходит в центрах размножения. Поэтому, в первые месяцы уменьшение численности лимфоцитов в этих структурах, скорее всего, отражает интенсивность дифференцировочных

процессов.

Однако, в поздние сроки, когда антигенная стимуляция уменьшилась ниже исходного уровня в связи с уменьшением лимфопритока к лимфатическим узлам после перевязки маточных труб, уменьшение численности лимфоцитов, по-видимому, обусловлено процессами склеротической трансформации, в которую могут быть вовлечены и лимфоидные фолликулы [Майбородин И.В. и др., 1998, 2001]. В данном случае иммунокомпетентные клетки просто исчезают из центров размножения и замещаются клетками стромы (сначала ретикулярными, затем – фибробластами и фиброцитами).

Относительное содержание иммуно- и плазмобластов через 1, 2 и 3 месяца было больше на 46,4 %, 50,2 % и 32,2 %, соответственно, чем в контроле. Численная плотность бластов спустя 1, 2 и 3 месяца была больше на 75,6 %, 77,1 % и 52,7 % соответственно, также по сравнению с контролем.

Возрастание численности иммуно- и плазмобластов в центрах размножения напрямую связано с объемом поступающих антигенов из региона лимфосбора. Когда антигенов много, дифференцировочная активность В-лимфоцитов высокая и содержание незрелых клеток тоже высокое. По мере падения антигенной стимуляции в связи с репарационными процессами в области послеоперационной раны и параллельным уменьшением лимфопритока, снижается и численность бластов. Определенное влияние на эти процессы оказывает и склеротизация коркового вещества, отмеченная выше.

Процент ретикулярных клеток через 4 и 5 месяцев стал больше на 29,7 % и 34,1 %, соответственно, относительно исходного состояния. Содержание клеточных элементов стромы на единицу площади среза спустя 4 и 5 месяцев было больше на 62 % и 72,5 %, соответственно, относительно контроля.

Скорее всего, этот процесс отражает склеротическую трансформацию коркового вещества лимфатических узлов, описанную нами выше и отмеченную другими исследователями при снижении лимфотока. При уменьшении пассажа лимфы через узел на основное место среди всех изменений выходит развитие склероза, и огрубление ретикулярной стромы является первым шагом в этом процессе [Rada I.O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Browse N.L., 1986; Майбородин И.В. и др., 1998, 2001, 2003б; Бородин Ю.И. и др., 2000].

Относительное количество макрофагов на 4 и 5 месяцах был больше в 2,1 и 3,1 раза, соответственно, чем у интактных животных. Абсолютное

содержание макрофагов спустя 4 и 5 месяцев было выше в 2,7 и 2,4 раза, также соответственно, по сравнению с контролем.

Возрастание численности макрофагов к концу наблюдения, наиболее вероятно, также связано с развитием склеротических процессов из-за уменьшения лимфопритока, так как макрофаги принимают активное участие в склеротической трансформации тканей.

Процент митозов через 1 и 2 месяца был больше на 84,3 % и 71,5 %, соответственно, чем в контроле. Численная плотность фигур митозов спустя 1 и 2 месяца была больше в 2,2, и 2,0 раза, соответственно, относительно исходного состояния.

Усиление митотической активности на 1-2 месяцах после операции, по-видимому, обусловлено самим хирургическим вмешательством, когда большой объем антигенных веществ, образующихся в поврежденных тканях, поступает в лимфатические узлы. Вследствие этого запускается пролиферация активированных В-клеток.

Относительное содержание клеток с признаками деструктивных изменений через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев было выше в 2,5, 2,5, 2,6, 2,3 и 2,6 раза, соответственно, по сравнению с интактным уровнем. Абсолютное число клеток с деструктивными изменениями спустя 2, 3, 4 и 5 месяцев было больше в 2,9, 2,9, 2,9 и 3,3 раза, соответственно, относительно контроля.

Увеличение количества клеток с явлениями деструкции в первые сроки после хирургического вмешательства, скорее всего, обусловлено как прямым действием токсинов и антигенов из места операции, так и резким усилением митотической активности, когда образуется множество клеток с хромосомными и другими повреждениями. К концу эксперимента количество нежизнеспособных клеточных элементов, видимо, напрямую зависит от склеротических процессов, когда прослойки соединительной ткани замещают структуры лимфоидной паренхимы узлов и нарушаются условия жизнедеятельности иммунокомпетентных клеток.

Изменения численности клеток в просвете мозговых синусов. Процент лимфоцитов через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев после начала эксперимента был ниже в 5,7, 4,8, 6,9, 2,9 и 2,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Содержание лимфоцитов на единицу площади среза только спустя 3 месяца было достоверно меньше контрольного уровня в 11,5 раза.

Большинство клеток, видимых на уровне световой микроскопии в просвете мозговых синусов, находятся или в лимфе или выстилают стенки этих

структур. Снижение численности лимфоцитов в просвете синусов, скорее всего, связано с уменьшением объема самой лимфы, который сокращается после перевязки маточных труб. Постепенно объемная плотность синусной системы восстанавливается и параллельно этому уменьшается степень отличий количества лимфоцитов от исходного уровня.

Относительное число ретикулярных клеток постепенно возрастало и на 4 и 5 месяцах стало статистически достоверно больше на 37,2 % и 45,9 %, соответственно, относительно состояния в контроле.

Ретикулярные клетки создают строму, каркас для мозговых синусов. Когда синусная система запустевает, ретикулярные клетки остаются на своих местах, их количество даже увеличивается вследствие сближения стенок синусов при отсутствии лимфы.

Не исключено, что количество клеток стромы возрастает из-за развития соединительной ткани в результате запустевания синусной системы – отсутствия лимфы. Отсутствие пассажа лимфы через лимфатический узел является одной из основных причин склероза данных органов [Rada I.O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Browse N.L., 1986; Майбородин И.В. и др., 1998, 2001, 2003б; Бородин Ю.И. и др., 2000].

Через 4 и 5 месяцев относительное количество макрофагов было больше в 5,9 и 5,2 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Возрастание численности макрофагов, которое идет параллельно изменениям содержания ретикулярных клеток, видимо, связано с процессами склеротической трансформации.

Процентное содержание клеток с деструктивными изменениями спустя 4 месяца было выше в 2,6 раза, чем в контроле.

Увеличение количества нежизнеспособных клеток на 4 месяце может быть связано с 2 возможными причинами. Во-первых, это результат гипоксии тканей после перевязки маточных труб вместе с сосудами. Гипоксия непосредственно приводит к гибели клеток.

Во-вторых, жидкость, находящаяся в полости матки при нарушении оттока (гидометре), служит прекрасной питательной средой для бактерий. Нельзя исключить присоединение инфекции в конце эксперимента и, как следствие этого, в синусной системе регионарных лимфатических узлов возрастает численность клеток с признаками деструкции. Причем, возможно, что эти клетки как попали в узлы вместе с током лимфы, так и сформировались на месте в результате непосредственного воздействия на структуры узлов

токсинов и антигенов из региона лимфосбора.

ВЫВОДЫ

1. В месте перевязки маточных рогов в эксперименте на крысах происходит атрофия эндометрия и образование синехий, что является не только визуальным, но и морфологическим подтверждением непроходимости данных структур.

2. В ранние сроки после моделирования гидрометры в регионарных к матке (подвздошных) лимфатических узлах происходит гипертрофия фолликулов без герминативных центров и с центрами размножения, в различных структурных отделах указанных органов на первый план выходят увеличение митотической активности, уменьшение численности лимфоцитов и возрастание числа иммуно- и плазмобластов, повышенное содержание клеток с признаками деструктивных изменений в ядре и цитоплазме. Такие реакции лимфатических узлов обусловлены влиянием клеточного и тканевого детрита из места хирургического вмешательства.

3. Через 4-5 месяцев после лигирования маточных рогов у крыс изменения в подвздошных лимфатических узлах обусловлены нарушениями лимфотока и заключаются в склеротической трансформации коркового и мозгового вещества органов, сужении коркового плато и паракортикальной зоны, уменьшении числа и размеров лимфоидных фолликулов, резком снижении количества иммуно- и плазмобластов, супрессии митотической активности, высокой численности тканевых базофилов, клеточных элементов стромы, макрофагов и клеток с явлениями деструкции.

4. Значительное развитие соединительной ткани в различных отделах подвздошных лимфатических узлов при гидрометре свидетельствует о нарушениях функций подвздошных лимфатических узлов как высокоспециализированной иммунокомпетентной ткани.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Степень изменений регионарных лимфатических узлов при нарушении оттока из полости матки необходимо учитывать при выборе методов лечения и определении прогноза заболевания. Любое проводимое лечение (как консервативное, так и хирургическое) при патологии матки может улучшить лимфоток, но не приводит к обратному развитию соединительной ткани в регионарных лимфатических узлах. В связи с нарушением функций лимфатических узлов целесообразен поиск методов их сохранения и быстрого

восстановления после ликвидации гидрометры.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А., Пекарев О.Г., Майбородина Е.И., Пекарева Е.О., **Ткачук О.К.** Морфологический анализ результатов введения аутологичных стволовых стромальных клеток костномозгового происхождения в рубец матки крыс // **Морфология. 2010.** Т. 138, № 6. С. 47-55, автора – 0,16 п.л.

2. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А., **Ткачук О.К.**, Майбородина Е.И., Пекарева Е.О. Рубец матки крыс после введения мезенхимальных стволовых клеток // **Вестн. Новосибирского гос. ун-та. Серия: биол., клин. мед. 2011.** Т. 9, № 2. С. 24-31, автора – 0,17 п.л.

3. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А., Пекарев О.Г., Майбородина Е.И., Пекарева Е. О., **Ткачук О.К.** Ангиогенез как результат введения мезенхимальных стволовых клеток в рубец матки крыс // **Молекулярная медицина. 2011.** № 4. С. 28-35, автора – 0,14 п.л.

4. Maiborodin I., Yakimova N., Matveeva V., Shevela A., Maiborodina E., Pekareva E., **Tkachuk O.** Angiogenesis in rat uterine scar after introduction after autological mesenchymal stem cells of bone marrow origin. // J. Biomedical Science and Engineering. 2011. Vol. 4. № 3. P. 164-172, автора – 0,16 п.л.

5. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А., Майбородина Е.И., **Ткачук О.К.** Ангиогенез в рубце миометрия крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения // Молекулярная медицина и биобезопасность: Сб. мат. VII междунаrod. конференции. М.: Изд-во «МДВ», 2010. С. 122-123, автора – 0,05 п.л.

6. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А., Майбородина Е.И., Артемьева Л.В., **Ткачук О.К.** Введение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения индуцирует ангиогенез в рубце мышечной ткани крыс // Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии: Мат. Всеросс. научно-практ. конф., посвящ. 20-летию Кузбасского кардиологического центра. Кемерово, 2010. С. 172-173, автора – 0,04 п.л.

Соискатель

О.К. Ткачук