

На правах рукописи

Бочкарева Алла Львовна

**МОРФОЛОГИЯ ЯИЧНИКОВ И АПОПТОЗ
В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ И ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЛАТОНИНОМ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

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 «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Новосибирск)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Мичурина Светлана Викторовна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Склянов Юрий Иванович

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

доктор медицинских наук, профессор
Обухова Лидия Александровна

(Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, профессор кафедры физиологии факультета естественных наук)

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

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

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

Автореферат разослан «_____» _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В современных условиях возрастает влияние высоких температур на организм человека в связи с освоением регионов с жарким климатом, развитием туризма и миграции, а также с работой в ряде отраслей промышленности (металлургической, угольной, горнорудной и др.). Вместе с тем известно широкое применение в народной и традиционной медицине различных тепловых процедур (сауны, бани, компрессы, горячие минеральные ванны). Накоплен обширный научный материал об использовании гипертермии для терапии онкологических, инфекционных, паразитарных заболеваний, наркозависимых состояний, СПИДа [Christophi С., 1998; Сувернев А.В. и соавт., 1999; Баллюзек Ф.В. и соавт., 2001; Киншт Д.Н., Киншт Н.В., 2006; Лопатин В.Ф., 2009; Repasky E.A., 2010]. При этом установлено, что гипертермия в диапазоне температур от 42,5 °С до 44,0 °С является экстремальным фактором внешней среды, на действие которого организм реагирует комплексом взаимосвязанных изменений, приводящих к глубоким расстройствам клеточных и внеклеточных взаимоотношений в биологических структурах [Козлов Н.Б., 1990; Kampinga Н.Н. et al., 1997]. В таких условиях значительную нагрузку испытывают репродуктивные органы.

Установлено, что в поддержании клеточного гомеостаза активное участие принимают механизмы программированной клеточной гибели. Согласно современной модели регуляции апоптоза считается, что отношение белков регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad, Bax определяет чувствительность клеток к воздействию апоптотических факторов и является «молекулярным переключателем», который определяет, будет происходить рост или атрофия ткани [Chevalier R.L. et al., 2000; Пальцев М.А., 2004; Мушкамбаров Н.Н., 2007]. В связи с этим, изучение морфологии яичников и процессов апоптоза в тканевом микрорайоне яичника при воздействии гипертермии необходимо для выяснения механизмов нарушений репродуктивной функции и бесплодия.

Доказано, что различные экстремальные воздействия приводят к нарушениям систем адаптации и детоксикации, а также к десинхронизации биоритмов организма (Гаркави Л.Х. и соавт., 1998). В восстановлении

нарушенного гомеостаза и оптимизации функции различных органов и систем принимает участие гормон эпифиза – мелатонин, являющийся основным синхронизатором эндогенных ритмов организма, мощным антиоксидантом и иммуномодулятором [Srinivasan V. et al., 2005; Arendt J., 2006; Арушанян Э.Б., 2010; Мендель В. Э., Мендель О. И., 2010]. Также мелатонин участвует в регуляции секреции половых гормонов и процессов полового созревания, обеспечивая тем самым полноценное функционирование репродуктивной системы [Rohr U.D., Herold J., 2002; Коркушко О.В., Шатило В.Б., 2003; Анисимов В.Н., 2006]. Изучение влияния введения мелатонина в условиях гипертермии на морфологию яичников и процессы апоптоза до настоящего времени не проводилось. Все вышеизложенное определило цель исследования.

Цель исследования. Изучение морфологических изменений яичников и процессов апоптоза в яичниках крыс (на примере оценки активности белков регуляторов апоптоза Bad и Bcl-2) в остром (3-и сутки) и восстановительном (7-е и 14-е сутки) периодах после однократного воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ) и введения мелатонина.

Задачи исследования

1. Изучить морфологические особенности яичников крыс в остром и восстановительном периодах после однократного воздействия высокой внешней температуры.

2. Изучить процессы апоптоза в клетках фолликулов и желтых тел яичников (на примере оценки активности белков регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad) в остром и восстановительном периодах после однократного воздействия высокой внешней температуры.

3. Оценить влияние мелатонина на морфологические особенности яичников крыс в остром и восстановительном периодах после однократного воздействия высокой внешней температуры.

4. Оценить влияние мелатонина на процессы апоптоза в клетках фолликулов и желтых тел яичников (на примере оценки активности белков регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad) в остром и восстановительном периодах после воздействия высокой внешней температуры.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование тканевого микрорайона яичников и процессов апоптоза в яичниках крыс в острый (3-и сутки) и восстановительный (7-е и 14-е сутки) периоды после воздействия высокой температуры и при введении мелатонина.

Впервые выявлено, что воздействие высокой температуры:

- приводит к значительным нарушениям венозного и лимфатического дренажа яичника, которые наиболее выражены на 3-и сутки (в острый период) после перегревания;

- вызывает нарушения фолликулогенеза, овуляции и усиление процессов атрезии фолликулов, наиболее выраженные на 7-е сутки (в раннюю фазу восстановительного периода) после перегревания;

- вызывает нарушения процессов преобразования желтых тел, усиливая процессы дегенерации и атрезии, наиболее выраженные на 7-е сутки после дестабилизирующего воздействия;

- приводит к изменению соотношения белков регуляторов апоптоза (преобладание проапоптотического белка Bad над антиапоптотическим белком Bcl-2) как в фолликулах, так и в желтых телах яичников, что свидетельствует об активации процессов апоптоза в органе.

Впервые установлено, что введение мелатонина в условиях перегревания:

- приводит к более быстрому восстановлению венозного и лимфатического дренажа яичника до уровня интактных крыс (уже на 7-е сутки после воздействия);

- приводит к ускорению восстановления первичных и преовуляторных фолликулов, а также к уменьшению процессов атрезии фолликулов (уже на 7-е сутки после перегревания);

- приводит к уменьшению повреждающего действия перегревания на морфологическую организацию желтых тел (на стадиях «железистого метаморфоза» и «расцвета») в остром периоде (на 3-и сутки) и более быстрому восстановлению желтых тел всех стадий развития начиная с 7-х суток после воздействия;

- приводит к сбалансированности процессов апоптоза и пролиферации,

снижает апоптотическую гибель клеток фолликулов и желтых тел яичников и, как следствие, уменьшает повреждающее действие перегрева на морфологическую организацию органа.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные морфологические данные об особенностях организации яичников с характеристикой их цитологического и молекулярного профилей при воздействии высокой температуры в острый и восстановительный периоды естественной реабилитации и при введении мелатонина имеют важное значение для практической деятельности. Обнаружены негативные эффекты воздействия высокой температуры на крово-и лимфообращение в органе, а также на процессы фолликулогенеза, развития желтых тел и программированной клеточной гибели (активация апоптоза) в яичниках. Установлено корригирующее влияние мелатонина на кровеносные и лимфатические сосуды, морфологическую организацию фолликулов, желтых тел яичников и на процессы апоптоза в яичниках в условиях перегрева. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования этого гормона в практике лечения нарушений генеративной функции, вызванных воздействием высокой температуры, а также являются основой для разработки патогенетической лимфотропной терапии заболеваний органов репродуктивной системы с помощью гормона эпифиза мелатонина.

Положения, выносимые на защиту

1. Воздействие высокой внешней температуры вызывает значительные морфологические изменения в тканевом микрорайоне яичников (нарушение лимфатического и венозного дренажа, значительные нарушения фолликулогенеза и процессов развития желтых тел), наиболее выраженные в острый период (3-и сутки) и в раннюю фазу восстановительного периода (7-е сутки) после ЭГ.

2. Действие высокой внешней температуры приводит к изменению соотношения белков регуляторов апоптоза (преобладание проапоптотического белка Bad над антиапоптотическим белком Bcl-2) как в фолликулах, так и в желтых телах яичников, что свидетельствует об активации процессов апоптоза

в органе.

3. Введение мелатонина ускоряет восстановительные процессы в яичниках, о чем свидетельствует более быстрое восстановление морфологической организации компартментов тканевого микрорайона яичников (уже с 7-х суток после перегрева).

4. Воздействие мелатонином приводит к сбалансированности процессов апоптоза и пролиферации, снижению апоптотической гибели клеток фолликулов и желтых тел на 7-е сутки после ЭГ и, как следствие, к уменьшению повреждающего действия перегрева на морфологическую организацию органа.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертации доложены на IV Съезде лимфологов России с международным участием (Москва, 2011), на X Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2011), на Евразийском симпозиуме «Проблемы саногенного и патогенного эффектов эндо- и экзозкологического воздействия на внутреннюю среду организма» (Чолпон-Ата, 2009), на Юбилейной выездной научной сессии «Актуальные вопросы клинической лимфологии» (Андижан, 2009), на Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2008).

Внедрение результатов работы в практику. Полученные данные об особенностях морфологической организации и процессов апоптоза в яичниках в условиях гипертермии и воздействия мелатонином внедрены в практику научно-исследовательской работы лаборатории ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Новосибирск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 2 – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК России для публикаций основных результатов исследования, получен один патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 197 страницах машинописного текста и состоит из введения, аналитического обзора литературы, характеристики материала и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 90 рисунками, 1 таблицей. Список литературы содержит 301 источник (193 отечественных и 108 зарубежных авторов).

Личный вклад автора. Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Новосибирск) (протокол № 86 от 16.04.2012).

В эксперименте использовались 155 крыс-самок линии «Вистар» (возраст 3 месяца, масса тела 180-200 грамм) из вивария Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета. Животные содержались при температуре воздуха 20 °С – 22 °С на стандартном пищевом рационе и свободном доступе к воде. Эксперименты проводились в зимне-весенний период с 10 до 12 часов.

Экспериментальные воздействия выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Животных, находящихся в фазе диэструс полового цикла, подвергали экспериментальной гипертермии в соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» (Ефремов А.В., Пахомова Ю.В. и соавт., 2001) однократно, до стадии теплового удара (ректальная температура 43,5 °С). Определение фаз полового цикла проводили методом вагинальных мазков.

Введение мелатонина (М) осуществляли в день проведения гипертермии и в последующие 2-е суток после захода солнца (по 0,1 мг мелатонина в 0,2 мл физиологического раствора). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом на 3-и, 7-е и 14-е сутки после однократного воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ). Сроки исследования были определены в соответствии с представлениями о фазности в течении постгипертермического периода: острый период после ЭГ (с первых часов до 3-х суток) и восстановительный период (с 7-х по 21-е сутки) [Пахомова Ю.В., 2006; Антонов А.Р., 2004]. Выделено 7 групп животных: 1-я – контрольная (интактные животные); проводилось взятие материала для исследований: 2-я группа – на 3-и сутки после ЭГ («ЭГ+3сут»), 3-я – на 7-е сутки после ЭГ («ЭГ+7сут»), 4-я – на 14-е сутки после ЭГ («ЭГ+14сут»), 5-я – на 3-и сутки после ЭГ и введения мелатонина («ЭГ+М+3сут»), 6-я – на 7-е сутки после ЭГ и введения мелатонина («ЭГ+М+7сут»), 7-я – на 14-е сутки после ЭГ и введения мелатонина («ЭГ+М+14сут»). В качестве объекта гистологического исследования использовали образцы яичников, которые забирали после декапитации животных под эфирным наркозом. Для светооптического исследования образцы яичников фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. На санном микротоме готовили парафиновые серийные срезы толщиной 5-6 мкм. После депарафинизации их окрашивали гематоксилином Майера, эозином и изучали под бинокулярным микроскопом при увеличении до 250^x. Методом точечного счета с использованием точечной морфометрической системы (121 тестовая точка) вычисляли относительные площади спиральных артерий, сосудов венозного сплетения и лимфатических сосудов яичника, а также примордиальных, первичных, вторичных, преовуляторных, атретических фолликулов и желтых тел на стадиях «пролиферации и васкуляризации», «железистого метаморфоза», «расцвета», «обратного развития».

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007, на PC Pentium 4 в

среде Windows с использованием статистического пакета «Statistica 5.5», с вычислением средних арифметических величин (M), стандартных ошибок средних (m) и критерия Стьюдента. Различия между контрольной и опытными группами считали достоверными при $p < 0,05$ [Автандилов Г.Г., 1990; Петри А., Сэбин А., 2010]. Иммуногистохимическое исследование по оценке уровней экспрессии белков регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad (на парафиновых срезах) проводили с помощью непрямого стрептавидин-биотинового метода [Эллиниди В. Н. и соавт., 2002; Kluck R.M. et al., 1997], используя набор Novostain 500, NCL-RTU-D. Срезы изучали при помощи моторизованного микроскопа M200 («Carl Zeiss»). Микрофотографии получали с помощью камеры AxioCam HRc («Carl Zeiss») при конечном увеличении в 630 раз. Количественную оценку интенсивности иммуногистохимической окраски на Bcl-2 и Bad в клетках фолликулов и желтых тел осуществляли с помощью компьютерной программы Axio Vision 4.7.1 («Carl Zeiss») и блока автоматических измерений (Auto measure). В программу статистических вычислений вводили значение процента площади позитивно окрашиваемых структур.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая организация и процессы апоптоза в яичниках крыс после однократного воздействия высокой внешней температуры.

На третьи сутки (в остром периоде) выявлено выраженное нарушение лимфатического и венозного дренажа в органе (расширение интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции, расширение и деформация лимфатических и венозных сосудов, застой тканевой жидкости в межтканевых пространствах, мозаичность кровенаполнения), различные проявления которого наблюдались и на 14-е сутки после перегревания. Нарушение крово- и лимфообращения, снижение кровотока в тканях приводят к развитию тканевой гипоксии [Султанов Ф.Ф. и соавт., 1988; Доброхотова Ю.Э. и соавт., 2002; Мичурина С.В., 2007]. Указанные изменения вызывают значительные нарушения фолликулогенеза и процессов развития желтых тел, усиление

процессов дегенерации и атрезии (Волкова О.В., 1983). Морфометрически это проявляется в снижении относительной площади примордиальных и первичных фолликулов, желтых тел на стадиях «железистого метаморфоза» и «расцвета», а также в увеличении относительной площади атретических фолликулов и желтых тел на стадии «обратного развития» (табл. 1). На 7-е сутки (в начальной фазе восстановительного периода) после ЭГ нами выявлено уменьшение выраженности нарушений в несосудистых путях микроциркуляции, а также в венозном и лимфатическом звеньях сосудистого русла яичников по сравнению с 3-ми сутками. Вместе с тем установлено, что на фоне улучшения лимфатического и венозного дренажа отмечается спазм артериол. По-видимому, обусловленная этими изменениями местная ишемия усугубляет соответствующие нарушения в корковом веществе яичника. Это подтверждают наши данные о почти полном исчезновении первичных фолликулов, значительном снижении относительной площади преовуляторных фолликулов, исчезновении желтых тел на стадиях «пролиферации и васкуляризации», «железистого метаморфоза» и «расцвета», а также выраженном увеличении относительной площади атретических фолликулов и желтых тел на стадии «обратного развития».

На более поздних сроках восстановительного периода (14-е сутки) на фоне улучшения гемодинамики и лимфоциркуляции (по сравнению с группой «ЭГ+7сут») отмечается увеличение относительной площади растущих и преовуляторных фолликулов, появление желтых тел начальных стадий развития, а также выраженное снижение относительной площади атретических фолликулов и желтых тел на стадии «обратного развития».

По данным компьютерной морфометрии, площадь иммуногистохимической окраски на антиапоптотический белок Bcl-2 в клетках фолликулярного эпителия яичников на 3-и сутки после перегревания достоверно увеличилась (почти в 2 раза) на фоне соответствующей контролю площади иммуногистохимической окраски на проапоптотический белок Bad.

Таблица 1

Относительная площадь структурных элементов яичника S, %; M ± m

Структура яичника	Контроль	3-и сутки		7-е сутки		14-е сутки	
		Гипертермия + физ.раствор	Гипертермия + мелатонин	Гипертермия + физ.раствор	Гипертермия + мелатонин	Гипертермия + физ.раствор	Гипертермия + мелатонин
Артерии	0,73 ± 0,11	0,73 ± 0,13	0,79 ± 0,14	0,39 ± 0,08*	0,67 ± 0,11 [#]	0,48 ± 0,09*	0,84 ± 0,15 [#]
Вены	2,66 ± 0,20	6,83 ± 0,60*	3,47 ± 0,26 [#]	2,44 ± 0,33	2,69 ± 0,27	1,01 ± 0,17*	2,69 ± 0,34 [#]
Лимфатические сосуды	1,37 ± 0,13	6,25 ± 0,61*	2,16 ± 0,25 [#]	2,88 ± 0,36*	1,15 ± 0,17 [#]	1,74 ± 0,14	0,84 ± 0,15 [#]
Примордиальные фолликулы	0,36 ± 0,03	0,14 ± 0,02*	0,15 ± 0,03*	0,14 ± 0,02*	0,18 ± 0,02*	0,18 ± 0,03*	0,14 ± 0,02*
Первичные фолликулы	0,51 ± 0,04	0,22 ± 0,01*	0,22 ± 0,02*	0,03 ± 0,002*	0,17 ± 0,01 [#]	0,28 ± 0,02*	0,24 ± 0,03*
Вторичные фолликулы	3,18 ± 0,21	6,61 ± 0,45*	6,30 ± 0,40*	4,98 ± 0,31*	5,52 ± 0,48*	5,74 ± 0,52*	5,97 ± 0,50*
Преовуляторные фолликулы	6,49 ± 0,62	6,60 ± 0,32	7,67 ± 0,51 [#]	2,61 ± 0,22*	10,80 ± 0,95 [#]	8,64 ± 0,62*	4,28 ± 0,46 [#]
Атретические фолликулы	0,60 ± 0,05	1,96 ± 0,16*	2,41 ± 0,18 [#]	15,04 ± 1,30*	5,80 ± 0,60 [#]	11,06 ± 1,08*	10,86 ± 0,92*
Желтые тела на стадии пролиферации и васкуляризации	13,28 ± 1,34	14,72 ± 1,30	12,88 ± 1,1	0	0	5,63 ± 0,40*	12,51 ± 1,10 [#]
Желтые тела на стадии железистого метаморфоза	16,22 ± 1,46	4,65 ± 0,36*	11,47 ± 1,00 [#]	0	1,96 ± 0,25 [#]	2,21 ± 0,09*	5,94 ± 0,46 [#]
Желтые тела на стадии расцвета	3,06 ± 0,25	0,95 ± 0,08*	1,66 ± 0,12 [#]	0	0,34 ± 0,04 [#]	0	1,04 ± 0,08 [#]
Желтые тела на стадии обратного развития	4,91 ± 0,20	7,17 ± 0,52*	8,45 ± 0,75 [#]	27,41 ± 2,45*	10,36 ± 0,80 [#]	8,26 ± 0,71*	8,16 ± 0,49*

* – достоверное отличие от группы контроля (p ≤ 0,05); # – достоверное отличие от группы без мелатонина (p ≤ 0,05)

В настоящее время считается, что такие изменения могут свидетельствовать о поступлении в эти клетки проапоптотических сигналов, а также об «аварийном» включении в этих клетках Bcl-2 – зависимой антиапоптотической защиты, связанной с появлением таких сигналов в организме [Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л., 2007; Мичурина С.В., Бородин Ю.И. и соавт., 2012]. В клетках желтых тел происходит синхронное увеличение площади иммуногистохимической окраски на белки Bcl-2 и Bad (в 2 раза), что указывает на сбалансированность процессов апоптоза и пролиферации в желтых телах яичников в остром периоде после воздействия. Как было отмечено выше, нарушение крово- и лимфообращения в тканях приводят к развитию тканевой гипоксии, которая является индуктором клеточной гибели. В соответствии с этим, к 14-м суткам после перегревания происходит значительное снижение интенсивности окрашивания антиапоптотического белка Bcl-2 на фоне выраженного окрашивания проапоптотического белка Bad как в фолликулах, так и в желтых телах яичников (площадь иммуногистохимической окраски на антиапоптотический белок Bcl-2 почти в 2 раза ниже контрольных величин). Таким образом, установлено, что действие высокой внешней температуры приводит к изменению соотношения белков регуляторов апоптоза (преобладание проапоптотического белка Bad над антиапоптотическим белком Bcl-2) как в фолликулах, так и в желтых телах яичников. Согласно данным литературы, подобные изменения свидетельствуют о «снятии» антиапоптотической защиты и активации процессов апоптоза в органе [Мичурина С.В., Бородин Ю.И. и соавт., 2012].

Морфологическая организация и процессы апоптоза в яичниках крыс в условиях гипертермии и воздействия мелатонином.

Нами установлено, что введение мелатонина после воздействия гипертермии приводило к менее выраженным нарушениям в тканевом микрорайоне яичника по сравнению с группами животных, не получавших мелатонин. Так, на 3-и сутки отмечалось уменьшение отечности и расширения интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции, а также деформации

и расширения лимфатических и венозных сосудов в группе крыс, получавших мелатонин. Выявлено более быстрое восстановление нарушений венозного и лимфатического дренажа яичника до уровня интактных крыс в группе животных с введением мелатонина (уже на 7-е сутки после воздействия). Вместе с тем установлено, что введение мелатонина, нормализуя кровообращение и лимфоциркуляцию в яичнике, создает условия для ускорения восстановления генеративных элементов яичника. Воздействие мелатонином приводит к уменьшению морфологических проявлений нарушения фолликулогенеза (на стадиях первичных, преовуляторных и атретических фолликулов) уже с 7-х суток после гипертермии. Также введение мелатонина приводит к уменьшению повреждающего действия перегрева на морфологическую организацию желтых тел уже в остром периоде (на 3-и сутки) и улучшению восстановления желтых тел на 7-е и 14-е сутки после ЭГ, что подтверждается данными морфометрического исследования. На 7-е сутки в группе с введением мелатонина появляются желтые тела на стадиях «железистого метаморфоза» и «расцвета», которых нет в группе без мелатонина, а также отмечается снижение (по сравнению с группой без мелатонина) относительной площади желтых тел на стадии «обратного развития». На 14-е сутки в группе с введением мелатонина относительная площадь желтых тел яичника на стадии «пролиферации и васкуляризации» восстанавливается до контрольных значений; относительная площадь желтых тел на стадиях «железистого метаморфоза» и «расцвета» восстанавливается значительно выше, чем в группе без мелатонина (табл.1). Таким образом, установлено корригирующее действие мелатонина на морфологическую организацию кровеносных и лимфатических сосудов, фолликулов и желтых тел яичников, особенно выраженное в восстановительный период (на 7-е и 14-е сутки после ЭГ).

Количественный анализ показал, что на 7-е сутки после ЭГ и воздействия мелатонином в клетках фолликулярного эпителия и желтых тел яичников отмечается выраженное уменьшение площади

иммуногистохимической окраски на проапоптотический белок Bad на фоне незначительного уменьшения площади иммуногистохимической окраски на антиапоптотический белок Bcl-2, что приводит к изменению соотношения белков регуляторов апоптоза (преобладание антиапоптотического белка Bcl-2 над проапоптотическим белком Bad) как в фолликулах, так и в желтых телах яичников. Приведенные данные свидетельствуют о снижении апоптотической гибели клеток фолликулов и желтых тел на 7-е сутки после ЭГ под влиянием гормона эпифиза мелатонина. На 14-е сутки площади иммуногистохимической окраски на белки Bcl-2 и Bad восстанавливаются до контрольных величин, иллюстрируя тем самым сбалансированность процессов апоптоза и пролиферации в фолликулах и желтых телах яичников при воздействии мелатонином. При этом обращает на себя внимание факт синхронных изменений активности «молекулярных переключателей» апоптоза белков Bcl-2 и Bad как в клетках фолликулярного эпителия, так и в клетках желтых тел яичников. Таким образом, воздействие мелатонином в условиях гипертермии ускоряет восстановительные процессы в тканевом микрорайоне яичников, приводит к снижению апоптотической гибели клеток фолликулов и желтых тел и, как следствие, к уменьшению повреждающего действия перегрева на морфологическую организацию органа.

ВЫВОДЫ

1. Действие высокой внешней температуры приводит к выраженным морфологическим изменениям в тканевом микрорайоне яичника, которые наблюдаются уже в остром периоде (на 3-и сутки) и сохраняются до 14-х суток (восстановительный период) после дестабилизирующего воздействия:

- выявлены значительные нарушения крово- и лимфообращения (расширение интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции, дилатация лимфатических и венозных сосудов, увеличение относительной площади вен и лимфатических сосудов), наиболее выраженные на 3-и сутки после воздействия;

- выявлены нарушения фолликулогенеза и процессов преобразования

желтых тел, усиление процессов атрезии фолликулов и желтых тел, которые наиболее выражены на 7-е сутки и сохраняются до 14-х суток после воздействия.

2. Действие высокой внешней температуры приводит к изменению соотношения «молекулярных переключателей» апоптоза Bcl-2 и Bad (преобладанию проапоптотического белка Bad над антиапоптотическим белком Bcl-2 как в фолликулах, так и в желтых телах яичников), что свидетельствует об активации процессов апоптоза в органе.

3. Введение мелатонина в условиях гипертермии активизирует восстановительные процессы в тканевом микрорайоне яичника:

– уже в остром периоде (на 3-и сутки) введение мелатонина приводит к уменьшению выраженности венозного застоя и лимфостаза (уменьшению отечности интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции, а также деформации и расширения лимфатических и венозных сосудов, снижению относительной площади вен и лимфатических сосудов);

– на 7-е сутки после гипертермии введение мелатонина приводит к уменьшению морфологических проявлений нарушения фолликулогенеза (на стадиях первичных, преовуляторных и атретических фолликулов);

– введение мелатонина приводит к уменьшению выраженности морфологических нарушений процессов развития желтых тел (на стадиях «железистого метаморфоза» и «расцвета») уже на 3-и сутки после перегревания, а также более быстрому восстановлению желтых тел всех стадий развития с 7-х суток после воздействия.

4. Введение мелатонина приводит к изменению соотношения белков регуляторов апоптоза (преобладание антиапоптотического белка Bcl-2 над проапоптотическим белком Bad) в фолликулах и желтых телах яичников на 7-е сутки после гипертермии, что свидетельствует о снижении апоптотической гибели клеток фолликулов и желтых тел.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мичурина С.В., Бочкарева А.Л., Белкин А.Д., Жданов А.П.,

Бочкарев И.Г. Морфометрический анализ сосудистого русла и желтых тел яичников в различные сроки после общей управляемой гипертермии (экспериментальное исследование) // **Хирург.** 2008. № 6. С. 9-13, автора – 0,13 п.л.

2. Мичурина С.В., **Бочкарева А.Л.**, Белкин А.Д., Жданов А.П., Мусихина М.А. Влияние общей управляемой гипертермии на яичники крыс // **Вестник НГУ. Серия: Биология, Клиническая медицина.** 2009. Т. 7, выпуск 3. С. 21-24, автора – 0,10 п.л.

3. Мичурина С.В., **Бочкарева А.Л.**, Жданов А.П. Количественный анализ изменений генеративных элементов и внутриорганный сосудистый русла яичников крыс в различные сроки после общей управляемой гипертермии // **Лимфология. Журнал имени С.У. Джумабаева (Узбекистан).** 2009. № 1-2. С. 54-55, автора – 0,08 п.л.

4. Мичурина С.В., Бородин Ю.И., **Бочкарева А.Л.**, Белкин А.Д., Бочкарев И.Г. Влияние мелатонина на сосуды, тканевую несосудистую микроциркуляцию и желтые тела яичников животных, подвергавшихся воздействию высокой температуры // **Кардиолог.** 2011, № 4. С.64-71, автора – 0,20 п.л.

5. Мичурина С. В., **Бочкарева А.Л.**, Архипов С.А., Ларионов П.М. Влияние гормона эпифиза мелатонина на желтые тела и апоптоз в яичниках животных, подвергавшихся воздействию высокой температуры // **IV съезд лимфологов России : материалы.** Москва, 2011. С.104-105, автора – 0,06 п.л.

6. Мичурина С.В., **Бочкарева А.Л.**, Белкин А.Д., Жданов А.П., Мусихина М.А. Количественная оценка изменений фолликулярного аппарата яичников в различные сроки после общей управляемой гипертермии в эксперименте // **Морфология и хирургия : сборник научных трудов.** Выпуск 6. Новосибирск : Сибмедиздат НГМУ, 2007. С. 133-138, автора – 0,15 п.л.

7. Мусихина М.А., Мичурина С.В., Белкин А.Д., Жданов А.П., **Бочкарева А.Л.** Влияние общей управляемой гипертермии на весовые и морфологические показатели почки // **Морфология и хирургия : сборник научных трудов.** Выпуск 6. Новосибирск : Сибмедиздат НГМУ, 2007. С. 139-142, автора – 0,10 п.л.

8. **Бочкарева А.Л.**, Мичурина С.В., Жданов А.П., Белкин А.Д. Морфометрический анализ сосудистого русла, овulatoryных фолликулов и желтых тел яичников в различные сроки после общей управляемой гипертермии (экспериментальное исследование) // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии : материалы Международной конференции. Новосибирск, 2008. Т. 1. – С 58-59, автора – 0,06 п.л.

9. **Бочкарева А.Л.**, Мичурина С.В., Белкин А.Д., Жданов А.П., Мусихина М.А. Морфометрический анализ сосудистого русла и фолликулярного аппарата яичников крыс в различные сроки после общей управляемой гипертермии (ОУГ) // Проблемы саногенного и патогенного эффектов эндо- и экзoэкологического воздействия на внутреннюю среду организма : материалы Евразийского симпозиума. Чолпон-Ата, 2009. С. 84-85, автора – 0,05 п.л.

10. Мусихина М.А., Мичурина С.В., Белкин А.Д., **Бочкарева А.Л.** Влияние общей управляемой гипертермии на весовые и гемоциркуляторные показатели почки // Проблемы саногенного и патогенного эффектов эндо- и экзoэкологического воздействия на внутреннюю среду организма : материалы Евразийского симпозиума. Чолпон-Ата, 2009. С. 238-241, автора – 0,13 п.л.

11. Мичурина С.В., **Бочкарева А.Л.**, Архипов С.А., Ларионов П.М. Влияние гормона эпифиза мелатонина на морфологические особенности фолликулов, желтых тел, гемо- и лимфоциркуляцию и процессы апоптоза в яичниках животных, подвергавшихся воздействию высокой температуры // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии : материалы X Международной конференции. Новосибирск, 2011. С 204–207, автора – 0,13 п.л.

12. Пат. 2418586 С 2 Российская Федерация, МПК А61К 31/4045; А61Р 15/08. Способ коррекции нарушений в репродуктивных органах, вызванных высокой температурой / Мичурина С.В., **Бочкарева А.Л.**, Бочкарев И.Г.; Новосибирский государственный медицинский университет. – № 2009122600 / заявл. 11.06.2009; опубл. 20.05.2011. Бюл. № 14. – 13 с., автора – 0,54 п.л.