На правах рукописи

Гвоздева Наталья Викторовна

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЯИЧНИКАХ КРЫС
ПРИ ЦИКЛОВОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ**

14.03.02 – патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Агеева Татьяна Августовна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Майборodin Игорь Валентинович

(Научно-исследовательский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, ведущий научный сотрудник лаборатории стволовой клетки)

доктор медицинских наук, профессор
Казачков Евгений Леонидович

(Челябинская государственная медицинская академия, заведующий кафедрой патологической анатомии)

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

Защита 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, 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 темы. Сегодня доказана возможность излечения от ряда опухолевых заболеваний крови, что связано с использованием эффективных полихимиотерапевтических программ, представленных сочетанием препаратов с различным механизмом действия и токсическим профилем: цитостатиков, антиметаболитов, противоопухолевых антибиотиков, стероидных гормонов [Шилин Д.Е., Игнашева Е.В., 1999; Mattle V. et al., 2005].

Современная противоопухолевая терапия отличается высокой агрессивностью, оказывая воздействие как на опухолевые, так и на здоровые ткани. Одними из основных мишеней неселективного действия цитостатиков являются ткани с высокой митотической активностью (костный мозг, слизистые оболочки, волосяные фолликулы, органы репродуктивной системы), для которых описаны основные клинико-морфологические эффекты формирующихся повреждений [Карпова Г.В., 1995; Гольдберг Е.Д., 1999].

Увеличение продолжительности жизни больных гемобластозами и увеличение количества онкологических “долгожителей” вообще, выдвинуло новую актуальную проблему – состояние здоровья и качество их жизни в период ремиссии онкозаболевания или после излечения от него [Лосева М.И. и др., 2005]. Так цитостатически индуцированное поражение яичников приводит к преждевременной менопаузе и даже бесплодию [Grigshy P. et al., 1995; Свансарова М., 2008], соответственно понимание закономерностей процессов репаративной регенерации поврежденных тканей важно для разработки реабилитационных программ, сохранения репродуктивной функции и качества жизни у пациентов после цитостатического лечения, особенно у лиц молодого возраста.

Органы репродуктивной системы у человека являются малодоступным объектом для изучения прижизненно, поэтому эффекты цитостатических повреждений прослежены преимущественно на основе клинико-лабораторных данных, а сведений об этапах разворачивающихся морфологических изменений явно недостаточно [Пылова И.В. и др., 2006].

Отсутствие полноценных данных о морфофункциональных изменениях в органах репродуктивной системы при многокурсовом лечении антибластомными средствами и особенно механизмах репаративной регенерации в них, обуславливает необходимость более тщательного экспериментального изучения этих процессов.

Цель работы. Изучить влияние повторных курсов полихимиотерапии и

процессы репаративной регенерации структурных компонентов яичника и слизистой оболочки матки крыс.

Задачи исследования

1. Изучить изменения эстрального цикла у крыс-самок в течение периода двукратного введения комплекса цитостатических препаратов.

2. Изучить патоморфологические изменения в структурных элементах яичников крыс-самок в сроки от суток до полутора месяцев после двукратного введения комплекса цитостатиков.

3. Оценить соотношение различных типов фолликулов в яичниках крыс в сроки от суток до полутора месяцев после двукратного введения комплекса цитостатиков.

4. Исследовать состояние сосудов яичников крыс в сроки от суток до полутора месяцев после двукратного введения комплекса цитостатиков.

5. Оценить патоморфологические изменения слизистой оболочки матки крыс после двух курсов полихимиотерапии.

Научная новизна. Впервые по данным цитологических влагалищных мазков показаны тяжелые нарушения эстрального цикла крыс, формирующиеся на фоне проведения двух курсов полихимиотерапии с развитием у большинства животных «недифференцируемых» изменений, цитологическая картина которых не соответствует фазам эструс и проэструс.

Впервые дана патоморфологическая характеристика фолликулогенеза, реакции сосудов стромы и паренхимы яичников крыс, а также состояния слизистой оболочки матки в течение 1,5 месяцев после двукратного введения комплекса цитостатиков.

Показано, что увеличение количества курсов полихимиотерапии сопровождается прогрессирующими альтеративными и атрофическими процессами во всех исследованных структурах яичников, прогрессирующей атрофией эндометрия, сохраняющимися в постцитостатический период в течение 1,5 месяцев наблюдения.

Впервые после двукратного введения комплекса цитостатиков оценены этапы процессов репаративной регенерации в фолликулах и сосудистом компоненте яичников, показана роль васкулогенеза в восстановлении фолликулогенеза яичников и морфологического состояния слизистой оболочки матки крыс.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные новые данные дополняют и уточняют механизмы цитотоксического

повреждения и репаративной регенерации в яичниках и слизистой оболочке матки, позволяют оценить возможные сроки структурно-функционального восстановления органов репродуктивной системы после многокурсовой полихимиотерапии. Полученные сведения могут стать основой для дополнения и модифицирования подходов к сохранению репродуктивной функции женщин, получивших многокурсовую полихимиотерапию, а также разработки реабилитационных программ для пациенток репродуктивного возраста.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Введение комплекса цитостатиков вызывает выраженные альтеративные изменения клеток фолликулярного эпителия преимущественно путем апоптоза, что обуславливает грубые нарушения эстрального цикла и вызывает атрофию слизистой оболочки матки, усугубляющиеся после повторного введения комплекса цитостатиков. Негативные эффекты структурно-функциональных изменений после введения цитостатиков сохраняются длительное время – в течение 1,5 месяцев наблюдения.

2. Двукратное введение антибластомных средств в течение 1 месяца постцитостатического периода сопровождается деструктивными изменениями эндотелия и стенок сосудов стромы с их последующим склерозом вплоть до полной облитерации, а также депрессией неоангиогенеза в желтых телах яичников, что обуславливает нарушения трофики и препятствует полноценному восстановлению структурно-функционального состояния яичников и слизистой оболочки матки.

3. Процессы восстановления фолликулогенеза ассоциированы с активацией васкулогенеза в паренхиме и строме яичников и регистрируются по истечении 1,5 месяцев от введения цитостатиков.

Апробация работы: Материалы исследования были представлены на ежегодной конкурсе-конференции «Авиценна» (Новоси́бирск, 2005, 2006, 2007), на XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008), на Всероссийской юбилейной научно-практической конференции патологоанатомов с международным участием к 100-летию со дня рождения профессора Подзолкова П.Г. (Красноярск, 2008), на III Съезде Российского общества патологоанатомов (Самара, 2009), на Межвузовской научной студенческой конференции «Интеллектуальный потенциал Сибири» (Новоси́бирск, 2012).

Апробация работы проведена 25 мая 2012 г. на объединённом заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-

приспособительных реакций» и сотрудников кафедры анатомии человека, кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в практику диагностической работы патологоанатомического отделения Городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска, в учебный процесс и научную работу кафедры патологической анатомии, кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Новосибирского государственного медицинского университета.

Публикации. Всего по теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России для публикаций основных результатов исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, общей характеристики материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами, 25 рисунками. Указатель литературы содержит 357 источников, из которых 212 отечественных и 145 зарубежных авторов.

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

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 9 от 15 января 2009 г.).

Экспериментальное исследование выполнено на 50 половозрелых самках крыс породы Вистар массой 180-200 г. Животные получены из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Содержание животных, проведение всех экспериментальных манипуляций и умерщвление животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Животным внутрибрюшинно двукратно (с интервалом в 7 дней) вводили комплекс препаратов, применяемый для лечения гемобластозов в клинике по программе СНОР: циклофосфан (21 мг/кг), адриамицин (2,1 мг/кг), винкристин (0,04 мг/кг) и преднизолон (2,1 мг/кг). Выбранная доза является 1/5 LD50.

Выбор данной схемы полихимиотерапии (ПХТ) был обусловлен тем, что данные препараты являются базовыми и входят в большинство современных схем лечения злокачественных заболеваний.

Объектом исследования служили яичники, матка и влагалищные мазки крыс, что позволило комплексно оценить структурно-функциональное состояние репродуктивной системы.

До введения цитостатиков, в течение 7 суток после 1-го курса полихимиотерапии и последующие 7 дней после второго курса введения цитостатиков у животных выполняли влагалищные мазки с целью определения фазы эстрального цикла.

Для гистологического и последующего иммуноморфологического исследования забирали яичники и матку животных через 1, 7, 14 суток, 1 и 1,5 месяца после повторного проведения ПХТ. Дизайн экспериментального исследования представлен в таблице 1.

Таблица 1

Дизайн экспериментального исследования

Дни исследования	Дни введения ПХТ	Этапы цитологического исследования	Этапы гистологического исследования
1 день	–	Влагалищные мазки до введения цитостатиков	–
1 день	Введение 1-го курса ПХТ	–	–
1 – 7 дни	–	Влагалищные мазки	–
7 день	Введение 2-го курса ПХТ	–	–
1 – 7 дни	–	Влагалищные мазки	1 сутки – 10 животных
7 сутки	–	–	7 сутки – 10 животных
14 сутки	–	–	14 сутки – 10 животных
1 месяц	–	–	1 месяц – 10 животных
1.5 месяца	–	–	1,5 месяца – 10 животных

Для цитологического исследования ватными палочками получали мазки из влагалища крыс, окрашивали по Романовскому. Под микроскопом верифицировали фазу эструс и проэструс, соответствующую колебаниям гормонального баланса в организме животных.

Для гистологического исследования забирали оба яичника и матку.

Гистологический материал фиксировали в 10 % растворе формалина, проводили в серии спиртов и изготавливали парафиновые блоки в соответствии с принятыми методиками [Автандилов Г.Г., 1994]. На санном микротоме изготавливали парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином Майера и эозином, по Ван-Гизону, [Меркулов Г.А., 1969], покрывали синтетической покровной средой «Bio Mount» (Bio Vitrum) и заключали под покровное стекло.

На гистологических срезах *морфометрическое исследование* тканевых структур проводили согласно рекомендациям, изложенным в работах, посвященных теоретическому обоснованию и конкретным примерам применения этих методов [Weibel E. R., 1979; Автандилов Г.Г., 1990].

В яичнике проводили подсчет численной плотности (N_v) и соотношения первичных фолликулов, вторичных ранних и поздних фолликулов, фолликулярных кист (средние и крупные антральные фолликулы, подвергшиеся кистозно-атретической трансформации) и желтых тел, измеряли диаметр фолликулов (мкм). Оценивали состояние артерий мозгового вещества яичников, вычисляя численную плотность сосудов (N_v): с отеком и набуханием эндотелия, отеком и набуханием стенки, наличием плазматического пропитывания и кровоизлияний в стенку, очаговых некрозов стенки, аневризматических изменений, склероза и гиалиноза, дилатации. В матке измеряли толщину слизистой оболочки в 4 точках каждого среза (мкм).

Морфометрический анализ материала проводили при увеличении в 400 раз с использованием объект- и окуляр-микрометра, морфометрической сетки, при помощи программ анализа изображений «Диа-Морф Cito W» (Москва, Россия) и Морфология 5.0 («Видео Тест», Санкт – Петербург, Россия).

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах яичников с использованием первичных антител к VEGF (BioCare Medicine) и CD34 (Spring BioScience). Экспрессия VEGF определялась в виде окрашивания цитоплазмы лютеиновых клеток желтых тел, эндотелиальных клеток и клеток стромы яичников. Для оценки интенсивности экспрессии VEGF в желтых телах использовали полуколичественный метод: 1 балл – позитивное окрашивание лютеиновых клеток менее 30 % площади желтого тела; 2 балла – от 30 % до 70 % площади желтого тела; 3 балла – более 70 % площади желтых тел. Экспрессия CD34 определялась в эндотелиальных клетках сосудов, что использовали для подсчета общей численной плотности (N_v) сосудов стромы и желтых тел. Для проведения ИГХ-исследования срезы яичников толщиной в

3 мкм подвергали стандартной обработке (Dabbs D., 2009). Время экспозиции с первичными антителами составляло 30–40 минут при температуре 37 °С. Затем срезы инкубировали со стрептавидин-пероксидазным комплексом, DAB-субстратом и дополнительно докрашивали гематоксилином Майера, покрывали синтетической покровной средой «Bio Mount» (Bio Vitrum) и заключали под покровное стекло.

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на микроскопе Axiostar Plus (Zeiss) с использованием цифровой фотокамеры AxioCam ICc3 (Zeiss). Изучение структурной организации яичников и матки проводили при увеличении светового микроскопа до 1000 раз.

Статистическую обработку полученных данных проводили, руководствуясь рекомендациями для статистической обработки медико-биологических объектов, при помощи программы статистической обработки данных SPSS 16.1 для Windows. Числовые данные выражали в виде средней арифметической величины и ошибки средней ($M \pm m$).

В случае нормального распределения достоверность различий определяли с использованием t-критерия Стьюдента (достоверность различий между средними значениями признаков выявляли для уровней значимости $< 0,05$). Для сравнения абсолютных значений альтернативных качественных признаков использовали непараметрический критерий χ^2 («кси-квадрат»). Во всех случаях использовали двусторонние варианты критериев. При сравнении нескольких групп между собой делали поправку на множественность сравнений [Гланц С., 1999].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цитологическое исследование влагалищных мазков крыс до полихимиотерапии и их оценка после введения цитостатиков. О функции яичников грызунов и о стадии полового (эстрального) цикла легко судить по данным, полученным при исследовании влагалищных мазков, поскольку периодически повторяющиеся изменения во влагалищном эпителии половозрелых самок соответствуют циклическим процессам в яичниках, яйцеводах и матке [Гиляров М.С., Бабаев А.А. и др., 1986].

Исходно до проведения ПХТ у всех крыс-самок были идентифицированы фазы эстрального цикла: фазу эструс имели 54 % самок, а у 46 % изменения соответствовали фазе проэструс полового цикла. Далее в течение проведения 2 курсов ПХТ у части животных морфологическое состояние клеток во влагалищном мазке не соответствовало цитологической картине «эструс» и

«проэструс» с наличием дистрофически измененных клеток плоского эпителия, проявлений дискариоза, апоптотических и некротических изменений. Соответственно, данная цитологическая картина была квалифицирована как «недифференцируемые» изменения, доля которых достигла предельно высоких цифр после проведения 2-го курса ПХТ.

Через 1 сутки после первого введения комплекса цитостатиков у 44 % животных изменения соответствовали фазе эструс, у 24 % – фазе проэструс, а у 32 % самок изменения были квалифицированы как «недифференцируемые». Через 7 суток, накануне второго курса ПХТ животных в фазе эструс и проэструс было примерно равное количество (26 % и 30 %), а доля «недифференцируемых» изменений составила 44 %. После повторного введения курса цитостатических препаратов «недифференцируемые» изменения через 6 суток имели уже 84,4 % крыс-самок, лишь у 15,6 % присутствовали морфологические признаки проэструса, а эстральная активность вообще отсутствовала. На 7 сутки после 2 курса ПХТ морфологические признаки эстрального влияния также отсутствовали, «недифференцируемые» изменения имели 66,7 % самок, количество животных, имеющих изменения характерные для проэструс, увеличилось до 33,2 %. Данные проявления отчетливо демонстрируют развитие выраженных нарушений эстрального полового цикла у животных, обусловленных негативным влиянием двукратного введения комплекса цитостатиков на яичники, что определяет дисбаланс гормонального фона.

Патоморфологические изменения яичников крыс в процессе введения двух курсов ПХТ. В яичниках интактных крыс до введения комплекса цитостатиков наибольшую долю представляли вторичные поздние фолликулы – их численная плотность была $36,1 \pm 0,53$ (41,8 % от общего числа фолликулов), вторичные ранние фолликулы составили $22,2 \pm 4,44$ (25,7 %), первичные фолликулы – $16,3 \pm 0,76$ (18,9 %), фолликулярные кисты занимали наименьшую долю – $14,1 \pm 0,35$ (14,3 %).

Через 1 сутки после проведения 2 курсов ПХТ в сравнении с интактными животными были выявлены дистрофические и апоптотические изменения клеток гранулезы, которые определялись на протяжении всего периода эксперимента, начиная с 1 дня после введения ПХТ и сохраняющиеся до 1 месяца наблюдения. Максимальные деструктивные изменения были отмечены в наиболее активно пролиферирующих вторичных поздних фолликулах. Численная плотность всех видов фолликулов через 1 сутки

составила – $72,1 \pm 1,37$ (83,6 % от значения показателя в контроле), снизившись преимущественно за счет доли первичных фолликулов и вторичных поздних фолликулов. Через 7 суток после 2 курсов ПХТ сохранялись выраженные деструктивные изменения фолликулярного эпителия, соответственно дополнительно снизился показатель общей численной плотности фолликулов (до 74,4 % от значения показателя в контроле), при уменьшившихся показателях численной плотности первичных фолликулов, вторичных ранних и поздних фолликулов, но возросшей в 1,4 раза доле фолликулярных кист. Необходимо отметить, что фолликулярные кисты в постцитостатическом периоде имели морфологические признаки дегенеративно измененных созревающих фолликулов, отражающие невозможность их «продвижения» в процессе созревания. Через 14 суток общее количество фолликулов в сравнении со сроком 7 суток незначительно увеличилось: их численная плотность составила $75,3 \pm 1,17$, при этом возросло количество первичных фолликулов, составив $24,5 \pm 0,75$, что свидетельствует об активации фолликулогенеза на этом сроке. Однако, зарегистрированное дополнительное снижение численной плотности вторичных ранних фолликулов (на 6,1 % в сравнении с 7 сутками), увеличение численной плотности вторичных поздних фолликулов (на 12,7 %) и высокий уровень дегенеративных фолликулярных кист свидетельствуют о наличии гормонального дисбаланса и неэффективном фолликулогенезе на этот срок. Через 1 месяц после 2 курсов ПХТ общая численная плотность фолликулов в сравнении с контролем сохранялась на низком уровне (79,3 %), при этом численная плотность первичных фолликулов была ниже аналогичного показателя на 14 сутки на 13,5 %, составив $21,2 \pm 1,04$, а вторичных поздних фолликулов – на 36,8 %, составив $12,9 \pm 0,63$, при их меньших размерах.

Таким образом, даже через 1 месяц после проведения 2 курсов ПХТ не произошло восстановление фолликулогенеза, а сохранялись дегенеративно-атрофические изменения наиболее функционально активных фолликулов.

К 1,5 месяцам после 2 курсов ПХТ при микроскопическом исследовании в яичниках крыс морфологически наблюдали выраженные атрофические процессы: общая численная плотность фолликулов уменьшилась практически вдвое и составила $46,3 \pm 2,63$. Однако, хотя численная плотность первичных, а также дву- и многослойных вторичных ранних фолликулов по сравнению со значениями в контроле была ниже, суммарно эти типы фолликулов начальных этапов созревания составили 2/3 от общего числа, а также в них отсутствовали признаки кистозной дегенерации, что в совокупности свидетельствует о

признаках восстановления нормального фолликулогенеза. Было отмечено появившееся большое количество новообразованных мелких сосудов в строме яичников на этот срок.

Наиболее отчетливо нарушения фолликулогенеза демонстрирует динамика изменения численной плотности желтых тел – конечного результата эффективного фолликулогенеза. В постцитостатический период происходило постепенное снижение этого показателя в сравнении с контролем: через 1 сутки на 6 % и через 7 суток на 16 %, что свидетельствует о «разорвавшейся» цепи фолликулогенеза в результате некроза и апоптоза клеток гранулезы в этот период. Минимальные значения показателя были выявлены на сроке 14 суток наблюдения (на 30 % ниже контрольного значения), что обусловлено сохраняющимися существенными нарушениями гормонально опосредованного процесса трансформации фолликулов яичников. Незначительное увеличение показателя численной плотности желтых тел на 10 % в сравнении с 14 сутками было отмечено лишь к 1 месяцу, и этот показатель к 1,5 месяцам эксперимента не достигал уровня контроля составляя на 15 % меньше показателя контроля.

Обращает внимание, что в постцитостатический период желтые тела были меньшего размера и имели редуцированную сосудистую сеть, о чем судили по снижению показателя численной плотности сосудов желтых тел. Так на сроке 1 месяц, когда были отмечены начальные проявления восстановления фолликулогенеза, численная плотность сосудов желтых тел увеличилась на 25 % от показателя на сроке 14 суток, а на сроке 1,5 месяца увеличилась на 13 % в сравнении с показателем на 1 месяц, не достигнув уровня контроля (на 16 % ниже соответствующего показателя).

Диаметр фолликулов, выстланных фолликулярным эпителием, также прогрессивно уменьшался в постцитостатический период, достигнув минимума на сроке 1 месяц после проведения 2 курсов ПХТ, что было связано с некрозом и апоптозом фолликулярного эпителия в ранние сроки и атрофией фолликулов – в более поздние. Динамика изменений диаметра фолликулов коррелировала с показателем численной плотности фолликулов – было зарегистрировано увеличение показателя на 20 % лишь на сроке 1,5 месяца, не достигающее контрольного значения.

Выявленные изменения подтверждают прямое токсическое действие цитостатиков на активно пролиферирующий фолликулярный эпителий, прогрессирующее при увеличении числа курсов. На фоне проведения 2 курсов ПХТ отмечено развитие деструктивных изменений клеток гранулезы и

атрофические процессы в фолликулах, сохраняющиеся длительно (до 1,5 мес.) несмотря на короткий эстральный цикл у крыс (4-6 дней). В связи с этим на фоне недостаточной эстрогенной насыщенности регистрируются «недифференцируемые» изменения влагиалищного эпителия, что соответствует нарушениям гормональной функции половых желез по типу гипоэстрогеновых однофазных циклов [Hillier S. G., Zeleznik A. G. et al., 1980; Mattle V., Behringer K. et al., 2005].

Иммуногистохимическое исследование сосудистого компартмента и ангиогенных факторов в яичниках после проведения 2 курсов ПХТ. У интактных животных в яичниках при микроскопическом исследовании сосудов, окрашенных антителом к CD34, хорошо визуализировались эндотелиальные клетки, выявляя как сосуды стромы, так и сосуды желтых тел, что позволило оценить их численную плотность. Доля сосудов стромы яичника без патологических изменений эндотелия и стенки составила – 89 % ($28,9 \pm 0,13$), с отеком и набуханием эндотелия – 9%, с кровоизлияниями в стенку – 1% и с дилатацией просвета – 1%.

Морфометрический подсчет выявил, что после 2 курсов ПХТ через 1 сутки численная плотность неповрежденных сосудов стромы яичников достоверно снизилась до $22,0 \pm 1,1$ (83 % от общего их числа), до 16,5 % увеличилась доля сосудов с отеком и набуханием эндотелия. Через 7 суток доля сосудов без патологических изменений снизилась до 77 %, с признаками повреждения эндотелия - возросла, составив 21 %. Через 14 суток после 2 курсов ПХТ численная плотность сосудов стромы без патологических изменений не изменилась, но появились сосуды с очаговыми некрозами эндотелия и стенки ($3,78 \pm 0,21$ – 13 %). Через 1 месяц доля неповрежденных сосудов составила 63 %, с очаговыми некрозами стенки – 11%, с аневризматическими изменениями – 4 %, и стали определяться сосуды со склерозом и гиалинозом стенки, полной облитерацией просвета (суммарно 8 %). Необходимо отметить, что на этот срок в строме яичников стали определяться разрозненные и в виде небольших групп клетки стромы с экспрессией VEGF и CD34, показатель общей численной плотности сосудов стромы достиг контрольных значений, при этом в структуре идентифицируемых сосудов интерстиция яичников 11% пришлось на плотно лежащие в виде клубков новообразованные сосуды капиллярного типа. Через 1,5 месяца наблюдения в сравнении с контролем было зарегистрировано почти двукратное увеличение показателя общей численной плотности сосудов

($52,1 \pm 2,4$), именно за счет CD34-позитивных новообразованных сосудов капиллярного типа, доля которых составила 50 % от общего числа нормальных сосудов, на фоне сохраняющихся неизменными показателей склерозированных, облитерированных и аневризматически измененных сосудов (суммарно 10 %). При этом в строме увеличилось число VEGF- и CD34-позитивных клеток стромы. Данные изменения означают активацию процессов васкулогенеза и существенное увеличение бассейна сосудистого русла яичников через 1,5 месяца после проведения двух курсов ПХТ.

Оценивая циклический неоангиогенез в желтых телах яичников по экспрессии лютеиновыми клетками VEGF в условиях двукратного введения цитостатиков было получено: в контроле и через 1 сутки после 2 курсов ПХТ выявлена интенсивная диффузная экспрессия VEGF клетками желтых тел: $2,5 \pm 0,15$ и $2,4 \pm 0,15$ балла соответственно. Далее отмечали снижение доли клеток, экспрессирующих VEGF: через 7 суток произошло снижение показателя на 20 % в сравнении с показателем контроля ($1,9 \pm 0,09$), через 14 суток интенсивность экспрессии VEGF снизилась еще более существенно – в 1,5 раза в сравнении с показателем в контроле ($1,5 \pm 0,07$). Прогрессивное уменьшение числа лютеиновых клеток, экспрессирующих фактор роста эндотелия сосудов, сочеталось со снижением интенсивности окраски (концентрации белка) и происходило параллельно с отмеченным уменьшением показателей численной плотности и диаметра желтых тел в яичниках, а также численной плотности сосудов в них, что отражает глубокие нарушения процесса созревания желтых тел на эти сроки. Через 1 месяц после проведения двух курсов ПХТ выявили незначительное увеличение в сравнении с показателем на 14 дней интенсивности экспрессии VEGF в лютеиновых клетках желтых тел (на 17 %), составившее $1,75 \pm 0,12$; через 1,5 месяца на фоне значительно возросшего показателя численной плотности желтых тел (относительно значений на 7, 14 суток и 1 месяц) произошло увеличение интенсивности экспрессии фактора VEGF в лютеиновых клетках желтых тел, достигнув уровня $2,0 \pm 0,12$, что еще не соответствует контрольным значениям, однако указывает на создание необходимых условий для появления новообразованных сосудов и хорошей васкуляризации клеток желтых тел, возможности эффективного завершения цикла созревания фолликула.

Патоморфологическое состояние слизистой оболочки матки крыс после проведения 2 курсов ПХТ. У крыс контрольной группы слизистая оболочка матки составляет около 1/2 толщины стенки матки, поверхность

эндометрия имеет складчатый вид, железы имеют просвет овальной формы, строма равномерно распределена. Так у животных контрольной группы толщина слизистой оболочки эндометрия составила $185,0 \pm 17,77$ мкм. Через 1 сутки после двукратного введения цитостатиков толщина слизистой оболочки матки достоверно увеличилась за счет отека до $210,0 \pm 8,75$, через 7 суток снизилась до $154,0 \pm 8,99$ мкм, через 1 месяц показатель толщины слизистой оболочки эндометрия достиг минимальных значений $104,0 \pm 9,23$ мкм. Атрофия функционального слоя эндометрия развивалась в условиях структурно-функциональных нарушений в яичниках, морфологически отчетливо отражая сформировавшиеся сопряженные тяжелые нарушения гормонального статуса в репродуктивной системе. К полутора месяцам после 2 курсов ПХТ произошло увеличение показателя толщины слизистой оболочки эндометрия ($168,0 \pm 6,21$ мкм), произошедшее на фоне активного васкулогенеза в яичниках и позитивной регенераторной динамики показателей фолликулогенеза.

Таким образом, двукратное введение крысам-самкам противоопухолевых препаратов, принадлежащих к разным классам химических соединений, вызывает выраженные повреждения паренхиматозного и стромального компонентов яичников, формируя длительно сохраняющиеся нарушения морфо-функционального состояния в репродуктивных органах.

ВЫВОДЫ

1. Двукратное введение комплекса цитостатиков крысам сопровождается выраженными нарушениями эстрального полового цикла, что проявляется деструктивными и дискариотическими изменениями клеток плоского эпителия влагалища в цитограмме влагалищных мазков и реактивно-воспалительными изменениями слизистой оболочки матки. К 7 суткам после двух курсов полихимиотерапии в итоге у 84,4 % особей формируются «недифференцируемые» изменения цитограммы с исчезновением признаков гормонального влияния на влагалищный эпителий.

2. На фоне введения двух курсов полихимиотерапии происходят альтеративные изменения в фолликулах яичников и изменение соотношения их типов:

а) на ранних сроках (1-е и 7-е сутки) выявлена гибель клеток гранулезы фолликулов (апоптоз, некроз) в результате прямого цитотоксического действия лекарственных препаратов, что сопровождается уменьшением численной плотности всех фолликулов на 25,6 %, преимущественно за счет первичных фолликулов, доля которых уменьшается на 37,4 % от контроля;

б) через 1 месяц в яичниках происходит незначительное увеличение количества вторичных ранних фолликулов, при неизменно низком уровне численной плотности первичных и вторичных поздних фолликулов, выраженных процессах кистозной дегенерации созревающих фолликулов, что свидетельствует о сохраняющемся неполноценном фолликулогенезе в эти сроки;

в) через 1,5 месяца численная плотность всех видов фолликулов регистрируется на низком уровне, однако 2/3 из них представлены первичными и ранними вторичными фолликулами, что в совокупности с отсутствием признаков их кистозной дегенерации свидетельствует о начальных признаках восстановления эффективного фолликулогенеза.

3. Двукратное введение комплекса цитостатиков сопровождается нарушениями в сосудистом компоненте стромы и паренхимы яичников:

а) через 1-и и 14 суток отмечены альтеративные изменения эндотелия и стенок сосудов стромы, через 1 месяц регистрируются склеротические изменения сосудов стромы вплоть до облитерации просветов, параллельно отмечается увеличение числа VEGF- и CD34-позитивных клеток в строме и активация процессов новообразования сосудов, доля которых к 1,5 месяцам достигает 50 % от общего числа сосудов стромы на этот срок;

б) в желтых телах, начиная с 7 суток до 1 месяца постцитостатического периода происходит снижение интенсивности экспрессии VEGF лютеиновыми клетками, сопровождающееся снижением численной плотности новообразующихся сосудов в них. Через 1 и 1,5 месяца отмечено прогрессирующее увеличение интенсивности экспрессии VEGF лютеиновыми клетками и увеличение показателя численной плотности сосудов желтых тел, не достигающие значений контроля, но указывающие на развитие необходимых условий для завершения процесса созревания желтого тела.

4. В слизистой оболочке матки крыс после двукратного введения комплекса цитостатиков через 1 сутки регистрируются альтеративно-дисциркуляторные изменения с развитием прогрессирующей атрофии и уменьшением ее толщины к сроку 1 месяц на 43,8 % от значения контроля. Через 1,5 месяца происходит увеличение толщины слизистой оболочки матки в 1,6 раза относительно показателя на сроке 1 месяц, не достигающее уровня контроля.

5. На фоне повторяющихся курсов полихимиотерапии отмечаются морфо-функциональные изменения яичников и слизистой оболочки матки

крыс, которые сохраняются до 1,5 месяцев после введения цитостатиков. При этом первые признаки структурного восстановления фолликулогенеза в яичниках и структурно-функциональных изменений в слизистой оболочке матки регистрируются на сроке 1,5 месяца только после развития активных процессов васкулогенеза в строме и желтых телах яичников.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Агеева Т.А., Гвоздева Н.В.** Патоморфологическое исследование цитотоксических эффектов цикловой полихимиотерапии на органы репродуктивной системы крыс-самок // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** 2008. - С. 45 – 48, автора – 0,25 п.л.

2. **Гвоздева Н. В., Агеева Т. А.** Процессы репаративной регенерации в яичниках в условиях курсовой полихимиотерапии в эксперименте // **Медицина и образование в Сибири: электронный журнал.** 2012. - № 4. - 4 с. Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=769, автора – 0,25 п.л.

3. **Агеева Т.А., Гвоздева Н.В.** Динамика изменений состояния фолликулярного эпителия и сосудистого русла яичников при проведении полихимиотерапии у крыс-самок // **Хирургия, морфология, лимфология.** - 2007. - Т. 4, № 7. - С. 23–25, автора – 0,19 п.л.

4. **Агеева Т.А., Гвоздева Н.В.** Оценка состояния сосудистого русла яичников крыс – самок после введения цитостатиков и его роль в восстановлении фолликулогенеза // **Актуальные вопросы современной патологии : материалы Всероссийской юбилейной научно-практической конференции патологоанатомов с международным участием к 100-летию проф. П.Г. Подзолкова.** Красноярск, 2008. - С. 45 – 48, автора – 0,19 п.л.

5. **Агеева Т.А., Гвоздева Н.В.** Патоморфологические аспекты постцитостатических поражений сосудистого русла яичников крыс-самок и его роль в восстановлении фолликулогенеза // **Человек и лекарство: XV Российский национальный конгресс.** Москва, 2008. -С. 21 – 22, автора – 0,13 п.л.

6. **Гвоздева Н.В., Агеева Т.А.** Роль сосудистого русла яичников крыс-самок при восстановлении фолликулогенеза после многокурсовой полихимиотерапии // **Российское общество патологоанатомов: материалы III съезда.** Самара, 2009. - Т. 2. - С. 95 – 97, автора – 0,19 п.л.

7. **Гвоздева Н.В.** Патоморфология цитостатических эффектов полихимиотерапии на органы репродуктивной системы крыс-самок // **Авиценна-2006: материалы конкурса-конференции студентов и молодых ученых.** Новосибирск, 2006. - С. 66 – 67, автора – 0,13 п.л.

8. **Гвоздева Н.В.** Влияние цитостатических препаратов на состояние фолликулярного эпителия и эндотелия сосудов яичников // Авиценна-2007: материалы конкурса-конференции студентов и молодых ученых. Новосибирск, 2007. - С. 64 – 65, автора – 0,13 п.л.

9. **Гвоздева Н.В.** Фолликулогенез и состояние эндометрия у крыс на фоне полихимиотерапии // Интеллектуальный потенциал Сибири: Межвузовская научная студенческая конференция. Новосибирск, 2012. - С. 15 – 16, автора – 0,13 п.л.

10. Ageeva T.A., **Gvozdeva N. V.** Pathomorphological Study of the Cytotoxic Effects of Cyclic Polychemotherapy on Reproductive of Female Rats // Bulletin of experimental biology and medicine. Boston, 2008. - N. 6., Vol. 146. - P. 791–793, автора – 0,25 п.л.