

ПРОЦЕССЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ В ЯИЧНИКАХ В УСЛОВИЯХ КУРСОВОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

[Н.В. Гвоздева²](#), [Т.А. Агеева¹](#)

*¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития (г. Новосибирск)*

*²ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница»
(г. Новосибирск)*

Изучено влияние повторных курсов полихимиотерапии (ПХТ) на процессы репаративной регенерации структурных компонентов яичника и слизистой оболочки матки крыс. Половозрелым крысам породы Вистар внутрибрюшинно двукратно (с интервалом в 7 суток) вводили комплекс препаратов по программе СНОР: циклофосфан (21 мг/кг), адриамицин (2,1 мг/кг), винкристин (0,04 мг/кг) и преднизолон (2,1 мг/кг). Объектом исследования служили яичники, матка и влагалищные мазки крыс. Гистологическое исследование проводили в сроки 1, 7, 14-х суток, 1 и 1,5 месяца после повторного проведения ПХТ. Данные эксперимента отчетливо демонстрируют некроз и апоптоз клеток фолликулярного эпителия, нарушение фолликулогенеза, развитие нарушений эстрального полового цикла, что свидетельствует о негативном влиянии цитостатиков на яичники. Морфологические признаки неполного восстановления фолликулогенеза в виде компенсаторного ангиоматоза микроциркуляторного русла яичников, и структурно-функциональные признаки восстановления созревания фолликулов были зарегистрированы к 1,5 месяцам эксперимента.

Ключевые слова: полихимиотерапия, яичники, репаративная регенерация.

Агеева Татьяна Августовна — доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 225-07-37, e-mail: ageta@mail.ru

Гвоздева Наталья Викторовна — врач клинической лабораторной диагностики патологоанатомического отделения ГБУЗ НСО «ГНОКБ», рабочий телефон: 8(383) 315-96-37, e-mail: n.gvozdeva@ngs.ru

Введение. Достигнутый существенный прогресс в понимании молекулярно-генетических механизмов канцерогенеза, расшифровка генетических и хромосомных повреждений при ряде онкологических патологий, в частности при гемобластозах, позволило разработать

и внедрить эффективные схемы полихимиотерапии (ПХТ), добиться излечения больных. Однако применения агрессивных схем ПХТ привело к развитию ряда состояний, которые значительно повлияли в худшую сторону на здоровье излеченных пациентов [5]. Одними из органов-мишеней цитостатиков являются органы репродуктивной системы, как активно пролиферирующая ткань [2, 3]. Степень выраженности постцитотоксических осложнений в органах репродуктивной системы непосредственно определяет сохранение репродуктивной функции и полноценной семейной жизни у данной когорты больных [4, 6].

Цель исследования: изучить влияние цикловой ПХТ и процессы репаративной регенерации на яичники крыс.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование выполнено на 50-ти половозрелых самках крыс породы Вистар массой 180–200 г. Животные получены из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Животным внутрибрюшинно двукратно (с интервалом в 7 дней) вводили комплекс препаратов, применяемый для лечения гемобластозов 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 ПХТ был обусловлен тем, что данные препараты являются базовыми при проведении химиотерапии злокачественных заболеваний и входят в большинство современных схем лечения.

Объектом исследования служили яичники, матка и влагалищные мазки крыс-самок, что позволило комплексно оценить состояние репродуктивной системы. До введения цитостатиков в течение семи суток после 1-го курса ПХТ и последующие 7 дней после второго курса введения цитостатиков у крыс-самок выполняли влагалищные мазки с целью определения фаз эстрального цикла.

Взятие материала для гистологического исследования проводили через 1, 7, 14 суток, 1 и 1,5 месяца после повторного проведения ПХТ. С помощью эфира животных умерщвляли и извлекали яичники и матку для последующего морфологического исследования.

Методом морфометрии подсчитывали численную плотность (Nv) фолликулов разных типов на этапах фолликулогенеза и сосудов желтых тел, измеряли диаметр фолликулов и толщину слизистой оболочки матки (мкм).

Содержание животных, проведение всех экспериментальных манипуляций и умерщвление животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Результаты исследования. О функции яичников грызунов и о стадии полового (эстрального) цикла легко судить по данным, полученным при исследовании влагалищных мазков.

До введения комплекса цитостатиков фазу эструс имели 54,0 % крыс — самок, а фазу проэструс — 46,0 %. В цитологических мазках, полученных ежедневно в процессе двукратного введения комплекса цитостатиков, было отмечено неуклонное нарастание дистрофических изменений многослойного плоского эпителия влагалища крыс — самок и изменение фона мазков. Через 1 сутки после первого курса ПХТ в цитологических мазках преобладали воспалительные процессы: мазки содержали большое количество

нейтрофильных лейкоцитов, клетки плоского эпителия были с выраженными деструктивными изменениями в виде некроза и апоптоза, индуцированные токсическим влиянием цитостатиков. На фоне введения цитостатиков в части мазков цитологическая картина не соответствовала фазам эструс и проэструс, и изменения были квалифицированы как «недифференцируемые», доля которых нарастала после второго курса ПХТ.

Если после первого курса ПХТ «недифференцируемые» изменения имели на 1-е сутки 32 % животных, на 4-е сутки — 16 % животных, а к 7-м суткам — 44 %, то после второго курса ПХТ в течение семи суток доля «недифференцируемых» изменений в цитологических мазках была стабильно более высокой. После повторного введения комплекса цитостатиков наиболее высокий уровень «недифференцируемых» изменений был зарегистрирован на 6-е сутки (у 84,4 % животных), и этот показатель незначительно увеличился до 66,7 % к 7-м суткам (против 44 % после 1-го курса ПХТ), без тенденции к восстановлению эстрального влияния на клетки многослойного плоского эпителия влагалища крыс, что характеризует исчезновение гормонального влияния на слизистую оболочку влагалища у большинства особей. Грубое нарушение эстрального цикла и соответственно нарушение гормонального фона эпителия влагалища обусловлено прогрессирующим снижением уровня эстрогенного влияния по мере увеличения числа курсов ПХТ.

Отмеченные изменения в цитограмме являются отражением нарушенного созревания и функционирования фолликулов в яичниках, морфологические изменения в фолликулах которых с увеличением срока наблюдения имели сложную динамику.

Микроскопически через 1-е сутки после проведения двух курсов ПХТ в яичниках выявляли процессы, соответствующие непосредственно гибели клеток гранулезы путем некроза и преимущественно апоптоза, с уменьшением на 27 % — первичных фолликулов и на 17 % — вторичных ранних и поздних фолликулов соответственно в сравнении с показателями до начала ПХТ (см. табл.).

Численная плотность (Nv) фолликулов яичников после двух курсов ПХТ												
Процессы		Конт- роль	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1 месяц	1,5 месяца	P1-2	P1-3	P-1-4	P1-5	P1-6
		1	2	3	4	5	6					
Всего		86,2±7,44	72,1±1,37	64,2±1,46	75,3±1,17	68,4±1,62	46,3±2,63	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05
Первичные		16,3±0,76	11,9±0,25	10,2±1,15	24,5±,75	21,2±1,04	15,4±1,11	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	Н.д.
Вто- рич- ные	Ран- ние	22,2±4,44	25,1±4,47	16,5±0,07	15,5±2,91	24,6±4,17	15,3±3,11	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
	Позд- ние	36,1±0,53	23,4±1,88	18,1±0,75	20,4±1,22	12,9±0,63	12,2±0,42	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05
Фоллику- лярные кисты		14,1±0,35	12,3±3,13	20,2±4,55	16,5±0,48	9,6±3,48	13,2±3,24	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.

Примечание: оценка достоверности различий (p) проводилась по методу Стьюдента; p ≤ 0,05 — различия достоверны, Н.д. — различия недостоверны

К 7-м суткам после двух курсов ПХТ на 38 % снизился показатель численной плотности первичных фолликулов, и на 26 и 50 % соответственно — вторичных ранних и поздних фолликулов (см. табл.).

На 14-м сутки после двух курсов ПХТ вдвое увеличилось количество первичных фолликулов, что, по-видимому, связано с проявлениями попытки дифференцироваться на минимальных уровнях гормонального воздействия на фолликулярный эпителий.

Через 1 месяц после проведения двух курсов ПХТ на фоне пониженной в сравнении с контролем на 20,6 % численной плотности всех фолликулов сохранялось нарушенное соотношение типов фолликулов. Если в контроле основная доля принадлежит вторичным фолликулам (в сумме около 70 %) с преобладанием вторичных поздних фолликулов, то через 1 месяц доля вторичных фолликулов в сумме составляет 55 %, причем большая часть из них принадлежит вторичным ранним фолликулам (табл. 1). К 1,5 месяцам численная плотность всех фолликулов не достигла уровня контрольных значений, что свидетельствует о еще неполноценных процессах фолликулогенеза в яичниках крыс на этот срок. Диаметр фолликулов также прогрессивно снижался на сроке 1, 7 и 14 суток наблюдения в постцитостатический период, что было связано с некрозом и апоптозом фолликулярного эпителия. Через 1 месяц после двух курсов ПХТ этот показатель был минимальным (в 2 раза ниже значения показателя контроля), демонстрируя атрофичное состояние фолликулов. Через 1,5 месяца произошло увеличение этого показателя лишь на 12,1 % в сравнении с показателем на 1 месяц.

Наиболее отчетливо нарушения фолликулогенеза демонстрирует динамика изменения численной плотности желтых тел, как показателя эффективности фолликулогенеза. В ранний постцитостатический период происходило постепенное снижение этого показателя: на 6 % через 1 сутки и на 16 % — к 7-м суткам, 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 % меньше этого показателя в контроле), что свидетельствует о прогрессировании нарушений гормонально обусловленного процесса трансформации фолликулов яичников. Увеличение показателя численной плотности желтых тел в 1,1 раза в сравнении с 14 сутками было отмечено лишь к 1 месяцу, и этот показатель не достигал к 1,5 месяцам эксперимента уровня контроля (на 15 % меньше показателя контроля).

При этом необходимо отметить, что в постцитостатический период часть желтых тел имели хорошо сформированную артериальную сеть, что свидетельствует об их полноценной трансформации, а часть желтых тел состояла только из лютеиновых клеток и имела редуцированную сосудистую сеть. Так на сроке 1 месяц, когда были отмечены начальные проявления восстановления фолликулогенеза, численная плотность сосудов желтых тел увеличилась на 25 % от срока 14 суток, к 1,5 — увеличилась на 13 % от срока 1 месяц, не достигнув уровня контроля (на 16% ниже показателя численной плотности желтых тел в контроле). Появление новообразованных мелких сосудов микроциркуляторного русла, является отражением процессов репаративной регенерации в яичниках и обязательным условием полноценного восстановления фолликулогенеза.

Отмеченные процессы восстановления фолликулогенеза были ассоциированы с изменениями показателя толщины слизистой оболочки матки. Если на срок 1 месяц этот показатель был снижен в 1,7 раза от контрольного значения, свидетельствуя об атрофии слизистой оболочки, то на срок 1,5 месяца произошло увеличение этого показателя на 39 % от показателя на 1 месяц эксперимента.

Выводы. Двукратное введение комплекса цитостатиков вызывает цитостатически индуцированную гибель фолликулов яичника, что проявляется нарушением фолликулогенеза с грубыми нарушениями эстрального цикла, регистрируемыми в цитологических мазках. Повреждение фолликулярного эпителия яичников, как активно пролиферирующих структур, сопровождается прогрессирующим уменьшением числа

первичных и вторичных фолликулов, нарушением созревания желтых тел. Только через 1 месяц после двукратного введения комплекса цитостатиков появляются начальные признаки компенсаторного ангиоматоза микроциркуляторного русла желтых тел яичников, что улучшало их структурно-функциональное созревание и соответственно к 1,5 месяцам эксперимента появились более отчетливые признаки восстановления полноценного фолликулогенеза. Необходимо отметить, что восстановление каскадно-аркадного пути развития и созревания фолликулов после введения схемы ПХТ происходит длительно, полностью не завершаясь к 1,5 месяцам наблюдения.

Список литературы

1. Агеева Т. А. Патоморфологические аспекты постцитостатических поражений печени и желудка при гемобластозах : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Т. А. Агеева. — Новосибирск : Изд-во Новосибирского гос. ун-та, 2002. — 43 с.
2. Гольдберг Е. Д. Индуцированная гибель клеток в развитии гипоплазии кроветворной ткани после цитостатического воздействия / Е. Д. Гольдберг, Г. В. Карпова, Е. А. Тимина, И. А. Хлусов // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — Т. 127, № 1. — С. 67–71.
3. Гольдберг Е. Д. Отдаленные эффекты токсического действия цитостатических препаратов на репродуктивную систему / Е. Д. Гольдберг, Т. Г. Боровская // Бюл. СО РАМН. — 2004. — № 2. — С. 32–35.
4. Демина Е. А. Применение КОК при лечении лимфогранулематоза / Е. А. Демина, Е. Е. Махова // Научно-информац. мед. журн. Гедеон Рихтер в СНГ. — 2001. — № 3 (7). — С. 44–47.
5. Лосева М. И. Отдаленные последствия противоопухолевой терапии гемобластозов / М. И. Лосева [и др.]. — Новосибирск : Арт-Авеню, 2005. — 346 с.
6. Mattle V. Fernal fertility after cytotoxic therapy-protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases / V. Mattle, K. Behringer, A. Engert, L. Wildt // Eur. J. Haematol. — 2005. — Vol. 75 (Suppl 66). — P. 77–82.

PROCESSES OF REPARATIVE NEOGENESIS IN OVARIES DURING THE COURSE POLYCHEMOTHERAPY IN EXPERIMENT

N.V Gvozdeva², T.A. Ageeva¹

¹*SEI HPE «Novosibirsk State Medical University Minhealthsocdevelopment» (Novosibirsk c.)*

²*SBHE NO «SNRCH»*

Influence of occasional courses of polychemotherapy (PCT) on processes of reparative neogenesis of structural components of ovary and mucosa of uterus at rats is investigated. Puberal Vistar rats were intraperitoneally twice given (with interval of 7 days) the complex of preparations according to CHOP program: Cyclophosphanum (21 mg/kg), adriamycin (2,1 mg/kg), Vincristinum (0,04 mg/kg) and Prednisolonum (2,1 mg/kg). The objects of research were ovaries, uterus and vaginal smears of rats. Histological research was performed in terms of 1, 7, 14th days, 1 and 1,5 months after occasional conduction of PCT. Experiment data distinctly show a necrosis and an apoptosis of cells of follicular epithelium, folliculogenesis disturbance, development of disturbances of estrous sex cycle that indicates the negative

influence cytostatics on ovaries. Morphological signs of incomplete restoration of folliculogenesis in the form of compensatory angiomatosis of microcirculatory bloodstream of ovaries, and structurally functional signs of restoration of follicles maturing were registered by 1,5 months of experiment.

Keywords: polychemotherapy, ovaries, reparative neogenesis.

About authors:

Ageeva Tatyana Avgustovna — doctor of medical sciences, professor of pathological anatomy chair at SEI HPE «Novosibirsk State Medical University Minhealthsocdevelopment», office phone: 8 (383)-225-07-37, e-mail: ageta@mail.ru

Gvozdeva Natalia Viktorovna — doctor of clinical laboratory diagnostics of pathoanatomical unit at SBHE NO «SNRCH», office phone: 8 (383) 315-96-37, e-mail: n.gvozdeva@ngs.ru

List of the Literature:

1. Ageeva T. A. Pathomorphologic aspects of post-cytostatic lesions of liver and stomach at hemoblastoses: autoref. dis. ... Dr. of medical sciences / T. A. Ageeva. — Novosibirsk: Publishing house of NSU, 2002. — 43 P.
2. Goldberg E. D. The induced death of cells in development of hypoplasia of hemopoietic tissue after cytostatic influence / E. D. Goldberg, G. V. Karpov, E. A. Timina, I. A. Khlusov // *Bul. experimental biology and medicine*. — 1999. — V. 127, № 1. — P. 67-71.
3. Goldberg E. D. The remote effects of toxic action of cytostatic preparations on genesial system / E. D. Goldberg, T. G. Borovskaya // *Bul. of SB RAMS*. — 2004. — № 2. — P. 32-35.
4. Demina E. A. Application of the COC at lymphogranulomatosis treatment / E. A. Demina, E. E. Makhova // *Scientific inform. medical jour. Gedeon Richter in the CIS*. — 2001. — № 3 (7). — P. 44-47.
5. Loseva M. I. Remote consequences of antitumoral therapy of hemoblastoses / M. I. Losev [etc.]. — Novosibirsk: Art Avenue, 2005. — 346 P.
6. Mattle V. Fermal fertility after cytotoxic therapy-protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases / V. Mattle, K. Behringer, A. Engert, L. Wildt // *Eur. J. Haematol.* — 2005. — Vol. 75 (Suppl 66). — P. 77–82.