

На правах рукописи

Толокольников Василий Александрович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ МАТКИ И
ЯИЧНИКОВ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ДЕФИЦИТЕ МАГНИЯ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.03.02 - патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград – 2016

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, государственном бюджетном учреждении «Волгоградский медицинский научный центр».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Смирнов Алексей Владимирович**.

Официальные оппоненты:

Маслякова Галина Никифоровна

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Щеголев Александр Иванович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий патологоанатомическим отделением Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Защита состоится «_____» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.01 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, площадь Павших борцов, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной научной библиотеке и на сайте государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; www.volgmed.ru)

Автореферат разослан «_____» _____ 2016г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Наталья Владимировна Григорьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Дефицит магния является одним из распространённых коморбидных состояний в Российской Федерации, что связано с нарушениями характера питания населения, урбанизацией, хроническими стрессовыми воздействиями, региональными особенностями, распространёнными заболеваниями желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, акушерско-гинекологической патологией, а также нерациональным использованием фармакологических препаратов [Спасов А.А., 2000; Петров В.И. и др., 2014; Желтова А.А. и др., 2015].

Магний является вторым среди микроэлементов по содержанию внутри клетки, участвует в более 600 ферментативных реакциях, стабилизации генома, необходим для терморегуляции, нормального функционирования нервной, сердечно-сосудистой, мочеполовой, костно-мышечной и других систем организма [Авцын А.П. и др., 1991; Спасов А.А. и др., 2012; Смирнов А.В. и др., 2015; Yogi A. et al., 2011], что объясняет многообразие проявлений при нарушении гомеостаза данного микроэлемента в организме. Разностороннее изучение проблемы алиментарного дефицита магния в настоящее время актуально, поскольку он играет важную роль в развитии артериальной гипертензии, бронхиальной астмы, инсулинорезистентности и сахарного диабета, бесплодия, нарушений течения беременности и родов [Иежица И.Н., 2008; Серов В. Н. и др., 2010; Baaij J. H. et al., 2015].

Отклонения от физиологических значений колебания уровня магния в организме женщины, приводят к нарушению менструального цикла, развитию предменструального синдрома, обострению экстрагенитальной соматической патологии, в т.ч. спастических состояний и подверженности высокому риску инфицирования. Недостаточность магния различной степени выраженности приводит к широкому спектру патоморфологических изменений в органах сердечно-сосудистой, выделительной, нервной, эндокринной систем, что сопровождается нарушением выработки гонадотропных и женских половых гормонов [Смирнов А. В. и др., 2011; Дадак К., 2013; Лебедева С.А. и др., 2015].

Несмотря на наличие разнообразных данных о роли магния в функциональных изменениях и патологических состояниях в репродуктивной системе, многие аспекты морфологических изменений в органах женской

половой системы при недостаточности магния и в условиях её фармакологической коррекции остаются отрывочными и противоречивыми [Parente L. et al., 2004; Christiane Y. et al., 2014].

Цель исследования

Выявление закономерностей морфофункциональных изменений матки и яичников крыс в условиях дефицита магния и его индуцированного патоморфоза.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать с использованием патологоанатомических методов исследования качественные и количественные структурные изменения в матке крыс при моделировании экспериментального алиментарного дефицита магния.

2. Исследовать качественные и количественные патоморфологические изменения в яичниках крыс экспериментальных животных при моделировании алиментарного дефицита магния.

3. С помощью иммуногистохимических методов выявить особенности экспрессии биомаркеров, обеспечивающих регуляцию апоптоза и гомеостаза магния, в различных структурных элементах матки и яичников при алиментарном дефиците магния.

4. Выявить особенности индуцированного патоморфоза алиментарного дефицита магния у крыс в матке и яичниках при фармакологической коррекции различными солями магния.

Научная новизна исследования

Впервые с использованием комплекса гистологических, гистохимических, иммуногистохимических методов исследования и программного компьютерного морфометрического анализа проведено изучение морфофункциональных преобразований в матке и яичниках в условиях экспериментального моделирования алиментарного дефицита магния. Морфогенез алиментарного дефицита магния характеризуется, преимущественно, повреждением высокоспециализированных структур матки и яичников с развитием выраженных атрофических и склеротических изменений в миометрии, эндометрии и корковом веществе яичников.

Структурные изменения, обнаруживаемые в матке и яичниках крыс в условиях алиментарного дефицита магния при комплексном исследовании с

использованием иммуногистохимических методов и последующего компьютерного морфометрического анализа, характеризуются адаптивным увеличением цитоплазматической экспрессии биомаркеров TRPM6, TRPM7, снижением экспрессии Vcl-2 и увеличением экспрессии Вах, что свидетельствует о сочетании в тканях изучаемых органов процессов апоптоза и изменений компенсаторно-приспособительного характера с преобладанием десмопластических процессов.

При индуцированном различными солями магния патоморфозе магнией дефицитного состояния отмечается общая тенденция сохранения десмопластических изменений в сочетании с различной степенью выраженности восстановления высокоспециализированных структур матки и яичников, ведущая к развитию неполной регенерации.

Научно-практическая значимость

Результаты исследования существенно уточняют данные о патоморфологических изменениях в органах женской репродуктивной системы при моделировании экспериментального алиментарного дефицита магния. Характеристика морфогенеза магнией дефицитных состояний может быть использована в патологоанатомической практике для разработки методов дифференциальной морфологической диагностики микроэлементозов, а также для диагностики структурных изменений в органах женской репродуктивной системы при индуцированном патоморфозе недостаточности магния. Результаты морфометрического и иммуногистохимического исследований могут быть использованы при изучении морфогенеза первичного и вторичного дефицита магния, при разработке новых способов фармакологической коррекции.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При моделировании алиментарного дефицита магния наиболее значимыми являются изменения, обусловленные процессами атрофии и нарушениями микроциркуляции с поражением, преимущественно, эпителиальных структур яичников и эндометрия, в миометрии ведущую роль играют десмопластические процессы с поражением стенок спиральных артерий и атрофия гладких миоцитов.

2. При комплексном морфологическом исследовании с использованием иммуногистохимических методов и последующим компьютерным морфометрическим анализом матки и яичников выявлено, что алиментарный дефицит магния, характеризуется адаптивным увеличением цитоплазматической экспрессии TRPM6, TRPM7, снижением экспрессии Bcl-2 и увеличением количества Вах-позитивных клеток, что свидетельствует о преобладании процессов апоптоза и десмопластических изменений над процессами компенсаторно-приспособительного характера.

3. Индуцированный солями магния патоморфоз алиментарного дефицита магния характеризуется неполным восстановлением паренхимы матки и яичников в сочетании с различной степенью выраженности десмопластических изменений, что приводит к развитию неполной регенерации.

Апробация работы

Основные результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на XVII, XVIII Региональной конференции молодых исследователей (Волгоград, 2012, 2013); IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Микроциркуляция в клинической практике» (Москва, 2012), IV Всероссийский съезд патологоанатомов (Белгород, 2013), 71-й, 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2013, 2014), межрегиональной научно-практической конференции «Итоги и перспективы развития патологоанатомической службы республики Саха (Якутия)» (Якутск, 2015), научно-практической конференции с международным участием «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции» (Пятигорск, 2015).

Внедрение результатов исследования

Полученные данные о морфофункциональных изменениях в матке и яичниках крыс при моделировании алиментарного дефицита магния представлены в печатных работах, докладах на научных конференциях. Основные результаты работы используются в диагностической работе ГБУЗ «Волгоградское областное патологоанатомическое бюро», патологоанатомического отделения НУЗ ОКБ на ст. Волгоград-1 ОАО «РЖД».

Результаты данного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» и научно-исследовательскую работу лаборатории морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 5 - в журналах перечня рецензируемых научных изданий Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты на соискание ученой степени кандидата наук.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста, содержит 38 таблиц, иллюстрирована 91 рисунком, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, главы результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Список литературы содержит 184 источника (97 - отечественных и 87 - зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Моделирование алиментарного дефицита магния проводили с использованием специальной магнидефицитной диеты, аналогичной диете, производимой фирмой MP Biomedicals (США). Экспериментальное моделирование, оценка функциональных и биохимических показателей у животных проводилась нами совместно с сотрудниками кафедры фармакологии ВолгГМУ (заведующий кафедрой д.м.н., проф., Заслуженный деятель науки РФ, академик РАН А.А. Спасов) и ГБУ «Волгоградского медицинского научного центра» (директор – академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор А.А. Спасов), которым мы выражаем искреннюю признательность и благодарность. 1-ю группу (n=10) составили интактные самки. Во 2-ю группу (n=10) вошли самки, находившиеся на магнидефицитной диете в течение 12 недель. Остальные группы животных находились на

магнийдефицитной диете 12 недель и с 9-й по 12-ю неделю получали перорально через зонд 50 мг/кг массы тела алиментарного магния в виде магния сульфат (3-я группа), магния аспарагинат (4-я группа), магния тауринат (5-я группа), магния хлорид (6-я группа).

Контроль продолжительности фаз эстрального цикла осуществляли по результатам исследования влагалищных мазков и результатам ректальной термометрии.

Фаза проэструса определялась отсутствием слизи в препарате, наличием во влагалищных мазках значительного количества зернистых эпителиальных клеток, полиморфно-нуклеарных лейкоцитов, колебанием ректальной термометрии несколько ниже $37,5^{\circ}\text{C}$, в эндометрии отмечался рост высоты эпителиоцитов покровного эпителия и экзокриноцитов желёз, увеличение количества митозов и сосудов стромы. В яичниках нарастали проявления обратного развития желтых тел.

Фаза эструса характеризовалась наличием во влагалищных мазках мелких эпителиальных и безъядерных клеток и самыми низкими значениями ректальной термометрии (менее $37,0^{\circ}\text{C}$), при гистологическом исследовании в эндометрии фиксировалась наибольшая высота эпителиоцитов желёз и покровного эпителия, отёчностью стромы, снижением митотической активности, в яичниках отмечались цветущие жёлтые тела.

Фаза метаэструса цитологически определялась наличием малого количества зернистых эпителиальных клеток и полиморфно-нуклеарных лейкоцитов, ректальная температура была выше 38°C . В эндометрии - выраженная вакуолизация эпителия желёз и покровного эпителия, нарастание митотической активности. В яичниках отмечались регрессирующие и вновь образованные желтые тела.

Фаза диэструса цитологически характеризовалась большим количеством слизи и полиморфно-нуклеарных лейкоцитов, а также незначительным количеством достаточно крупных зернистых эпителиоцитов и самыми высокими значениями ректальной температуры (более $38,5^{\circ}\text{C}$). При гистологическом исследовании покровный эпителий и эпителий желёз эндометрия были представлены низким кубическим эпителием с единичными митозами, клетки

стромы - с округлыми ядрами, в яичниках - крупные желтые тела и желтые тела с признаками регрессии.

Гистологическое исследование матки и яичников проводили по стандартной методике и с окрашиванием гематоксилином и эозином, по Мэллори и по Ван Гизону, для выявления гликогена использовали PAS-реакцию в модификации Mc Manus с амилазным контролем.

Иммуногистохимическое исследование биомаркеров TRPM6, TRPM7, Vcl-2 и Вах проводили в соответствии с рекомендуемым протоколом фирмы производителя. Для достоверности полученных результатов применяли позитивные и негативные контроли антител.

Микрофотосъемку гистологических микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105color» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Морфометрическое исследование проводилось с использованием модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США), Statistica 6,0 (StatSoft, Inc., США). В зависимости от характера данных использовали: ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса в сочетании с апостериорными критериями Дана (множественные сравнения для выборок разного объема); непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро-Уилка. Статистически значимыми расценивались изменения при $p < 0,05$, рассчитывали 95% доверительный интервал d-Коэна [Реброва О.Ю., 2002; Сергиенко В.И. и др., 2012].

Результаты исследования и их обсуждение

В нашем исследовании при определении длительности эстрального цикла у животных 2 группы по сравнению с животными группы 1, на 3-й месяц исследования достоверно уменьшилась продолжительность фазы эструса на 30,6% ($p < 0,05$) и фазы проэструса - на 24,6% ($p > 0,05$), отмечалось увеличение диэструса на 66,7% ($p < 0,05$) и фазы метаэструса - на 49,6 % ($p > 0,05$), что подтверждает участие магнийзависимых механизмов в гормональной регуляции функций органов женской репродуктивной системы.

В матке и яичниках животных 2 группы отмечалось неравномерно выраженное полнокровие, признаки спазма артерий и артериол, периваскулярный и интерстициальный отёк. В сосудах микроциркуляторного русла наблюдались нарушения кровообращения, которые были наиболее выражены в эндометрии и корковом веществе яичников.

Обнаруженное нами увеличение относительной площади коллагеновых волокон в миометрии при моделировании алиментарного дефицита магния свидетельствует о сочетании атрофии гладких миоцитов и активации десмопластических процессов, преимущественно, в периваскулярных областях.

Патоморфологические преобразования в матке крыс при экспериментальном моделировании алиментарного дефицита магния характеризовались развитием, преимущественно, атрофических процессов: уменьшалась толщина эндометрия на 55,44% ($p < 0,05$), миометрия на 69,75% ($p < 0,05$), снижалась объёмная доля желёз эндометрия и высота экзокриноцитов желёз эндометрия на 23,0 % ($p < 0,05$) и на 54,61 % ($p < 0,05$) соответственно; а также дистрофическими изменениями в однослойном столбчатом эпителии, экзокриноцитах желёз, что сочеталось с нарушениями гемодинамики. Подобный характер изменений соответствует формированию склеротических и атрофических изменений, выявленных в миокарде и почках при моделировании алиментарного дефицита магния [Паньшин Н.Г., 2011; Rubin H., 2014] и отражает, по видимому, направленность развития общепатологических процессов в различных органах при алиментарном дефиците магния.

Выявленное нами склерозирование стенок артерий в миометрии и яичниках характеризуется отсутствием достоверных различий и увеличением variability толщины сосудистой стенки в группе животных с алиментарным дефицитом магния, по сравнению с группой контроля, что может быть обусловлено различиями в нарушении транспорта магния в гладкомышечных клетках сосудистой стенки при его дефиците [Hamaguchi Y. et al., 2011].

При алиментарном дефиците магния в миометрии отмечался отек межмышечного пространства, периваскулярный отёк с участками дезорганизации соединительной ткани, отеком сосудистой стенки, спазмом

гладкой мускулатуры мелких артерий и артериол, полнокровием сосудов микроциркуляторного русла. Признаки спазма гладкой мускулатуры, преимущественно, в циркулярном слое миометрия, косвенно подтверждают развитие гипертонуса миометрия и спонтанного прерывания беременности при патологических процессах сопровождающихся дефицитом магния [Dennis A.T. et al., 2015; Chang E., 2015].

В условиях моделирования алиментарного дефицита магния отмечалось очаговое увеличение экспрессии TRPM7 в эндотелии сосудов микроциркуляторного русла эндометрия и в эндотелии, а также гладких миоцитах спиральных артерий миометрия при преобладании в мелких сосудах признаков нарушения кровообращения, периваскулярного отека в сочетании с прогрессирующим фиброзированием стенок более крупных сосудов артериального типа, что доказывает сочетание изменений, характеризующихся доминированием нарушений сосудистой проницаемости в микроциркуляторном русле и началом реализации десмопластических процессов в стенках артерий мышечного типа при повышении накопления магниевых транспортеров в эндотелиоцитах и гладких миоцитах. Различия в степени выраженности фиброза в миометрии и сосудистой стенке артерий, возможно, зависят как от региональных морфофункциональных особенностей сосудов микроциркуляторного русла, так и от способности магниевых каналов в условиях дефицита магния транспортировать ионы кальция внутрь клеток [Zholos A. et al., 2011; Yamasaki M., 2012]. Так, при изучении различий в степени выраженности фиброза в сосудистой стенке в сердце и почках при алиментарном дефиците магния выявлена тесная взаимосвязь с ультраструктурными признаками повреждения и адаптационными изменениями в клетках паренхимы [Паньшин Н.Г., 2011].

Отмечаемое в условиях длительного дефицита магния угнетение репродуктивной функции у самок крыс способствует снижению количества зачатий и увеличению числа невынашиваемых плодов (мест резорбций), развитию бесплодия [Спасов А.А. и др., 2012; Лебедева С.А. и др., 2015].

Описанные нами признаки обратимых повреждений преобладали в эндометрии у животных с алиментарным дефицитом магния. В однослойном столбчатом эпителии помимо дистрофических изменений отмечалось

неравномерное распределение и очаговая конденсация хроматина, зернистость цитоплазмы с очаговой вакуолизацией клеток, также отмечалась вакуолизация цитоплазмы в экзокриноцитах желёз эндометрия, что сопровождалось увеличением клеток с признаками апоптоза. Обратимые повреждения миоцитов миометрия были менее выражены и характеризовались, преимущественно, отёком стромы и гидropической дистрофией миоцитов. Учитывая результаты иммуногистохимического исследования с использованием антител к белку Вах, при моделировании алиментарного дефицита магния наиболее выраженные признаки апоптоза наблюдались в эпителиальных структурах и строме эндометрия, по сравнению с миометрием, что связано, по-видимому, с более высокой синтетической активностью эпителия внутренней оболочки матки [Li T.C. et al., 1990; Klentzeris L.D. et al., 1991].

При исследовании проапоптозного биомаркёра Вах отмечалось увеличение его экспрессии в эпителии желёз и в столбчатом эпителии эндометрия, что свидетельствует о большей склонности к апоптозу клеток с высокой синтетической активностью, данный процесс сопровождается развитием дистрофических изменений.

При исследовании биомаркера Bcl-2 в экзокриноцитах желёз эндометрия и клетках эндометриальной стромы отмечалось снижение относительной площади иммунореактивного материала на 77,21% ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой, что является признаком уменьшения количества клеток, блокирующих апоптоз, в эндометрии в условиях дефицита магния [Chen C. et al., 2015].

При исследовании отношения уровня экспрессии антиапоптозного протеина Bcl-2 к проапоптозному белку Вах в эндометрии животных с алиментарным дефицитом магния отмечалось снижение индекса на 20,51% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы, что свидетельствует об одновременном увеличении клеток склонных к апоптозу, при уменьшении количества клеток, блокирующих апоптоз [Chen C. et al., 2015; Сайнога Т.В., 2013], и способствует запуску компенсаторных процессов в виде атрофии, характеризующейся при морфометрическом исследовании снижением толщины эндометрия на 55,44% ($p < 0,05$) у животных с алиментарным дефицитом магния [Wang Y. et al., 2015].

Учитывая участие белка TRPM7 в регуляции клеточного роста и пролиферации и то, что его блокада приводит к угнетению клеточной пролиферации благодаря снижению магний-зависимого транспорта [Zierler S. et al 2011], обнаруживаемые нами атрофические изменения в женской половой системе крыс 2 группы, сопровождающиеся снижением относительной площади TRPM7-позитивных клеток, как в матке, так и в яичниках, по-видимому, связаны со снижением образования TRPM7.

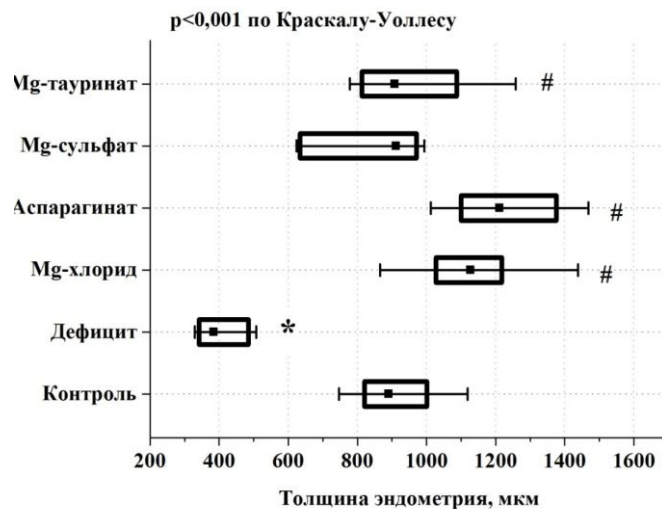
При гипомагниемии отмечается снижение активности TRPM-6 [Есенова И.И., 2011], увеличение экспрессии TRPM-6 при алиментарном дефиците магния в ткани матки, рассматривается как реализация адаптационных метаболических процессов, направленных на поддержание гомеостаза магния в экзокриноцитах желёз эндометрия, клетках стромы эндометрия, миоцитах миометрия, эндотелиоцитах сосудов.

Возрастание активности TRPM-7 при длительной гипомагниемии, способствует превалированию кальциевого тока над магниевым внутрь клетки, что приводит к срыву внутриклеточных компенсаторных механизмов и развитию повреждения [Schlingmann K.P., Gudermann T., 2005]. Выявленное нами увеличение интенсивности экспрессии TRPM-7 в эндотелии сосудов и гладких миоцитах артерий миометрия в условиях моделирования алиментарного дефицита магния свидетельствует о значительном увеличении кальций-опосредованного повреждения тканей матки. Снижение относительной площади и интенсивности экспрессии TRPM-7 иммунопозитивных клеток в ткани яичников характеризует активацию протективных клеточных механизмов, направленных на снижение интенсивности кальций зависимых процессов повреждения ткани.

Выявленные нами при патогистологическом исследовании яичников животных группы 2 признаки апоптоза, характеризовались увеличением относительной плотности (более чем в пять раз, $p < 0,05$) и интенсивности экспрессии Вах на 24,17% ($p < 0,05$) в лютеоцитах. Менее выраженная тенденция увеличения относительной плотности и интенсивности отмечалась и в изменении этих показателей (более чем в два раза, $p < 0,05$, и 3,37% $p > 0,05$, соответственно) экспрессии Bcl-2 привела и снижению индекса Bcl-2/Вах на

16,75%, $p < 0,05$ что свидетельствует об увеличении количества лютеоцитов, склонных к апоптозу [Zhou H. et al., 2003].

В патоморфогенезе дефицита магния существенную роль играют морфофункциональные изменения в виде нарушений кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла, развития обратимых и необратимых изменений, превалировании процессов апоптоза, более выраженных в эндометрии, миометрии и гормон продуцирующем аппарате яичников, что сопровождается изменением уровней экспрессии магниевых транспортёров TRPM6, TRPM7. Вышеуказанные патологические процессы способствуют фиброзированию, развитию склероза и атрофических изменений в матке и яичниках, что подтверждается результатами морфометрических исследований, например, изменением толщины эндометрия (рис.1).



* - $p < 0,001$ по отношению к группе 1 (интактные животные).

- $p < 0,001$ по отношению к группе 2 (животные с алиментарным дефицитом магния)

Рис. 1. Толщина эндометрия в экспериментальных группах.

Индукцированный патоморфоз алиментарного дефицита магния (группы 3,4,5,6) характеризовался положительной динамикой возникающих при гипомagneзиемии патогистологических изменений и положительной динамикой морфометрических показателей относительно группы алиментарного дефицита [Харитонов М.В. и др., 2011; Дадак К., 2013].

Наиболее выраженное воздействие на характер адаптационных процессов наблюдалось у животных в группе коррекции таурином магния (5 группа), отмечалось увеличение размеров клеток однослойного столбчатого эпителия на 141,2% ($p < 0,05$), высоты экзокриноцитов желез - на 120,5% ($p < 0,05$), объемной

доли ядер экзокриноцитов желез эндометрия – на 23,26% ($p < 0,05$), а также толщины эндометрия – на 137,07% ($p < 0,05$), и миометрия - на 195,28% ($p < 0,05$), площади лютеоцитов - на 29,52 % ($p < 0,05$), а также снижение площади их ядер на 4,69% ($p < 0,05$). Однако снижение объемной доли (ОД) желёз эндометрия на 50% ($p < 0,05$) не компенсировалось введением таурината магния (табл. 1, 2).

В процессе патоморфоза алиментарного дефицита магния, индуцированного тауринатом магния, выявлено снижение атрофических изменений, рост большинства морфометрических показателей с восстановлением их значений до контрольных цифр, при сохраняющихся отличиях в показателях ОД желёз эндометрия, что является проявлением компенсаторно-приспособительных процессов и репарации ткани.

Индуцированный сульфатом магния патоморфоз алиментарного дефицита магния (3-я группа) также характеризовался развитием в матке и яичниках признаков, характерных для субституции, что подтверждается уменьшением признаков повреждения и нормализацией части морфометрических показателей. В тоже время, не происходило полной компенсации патологических изменений, отмечались проявления фиброза миометрия, наблюдалось увеличение его толщины на 25,73% ($p < 0,05$) и выраженное снижение отношения эндометрия к миометрию на 62,57% ($p < 0,05$), при этом не отмечалось увеличения объемной доли мышечной ткани. Эпителиальные клетки в эндометрии были неравномерно изменены в размерах относительно контроля, высота экзокриноцитов желёз эндометрия увеличивалась на 42,5% ($p < 0,05$), закономерно приводя к увеличению ОД экзокриноцитов желёз эндометрия (на 31,0% при $p < 0,05$).

В яичниках индуцированный сульфатом магния патоморфоз алиментарного дефицита магния был менее выражен и характеризовался снижением выраженности атрофических изменений: в желтых телах, увеличивалась площадь лютеоцитов на 66,23% ($p < 0,05$) относительно животных группы 2.

Индуцированный патоморфоз алиментарного дефицита магния при коррекции аспарагинатом магния (группа 4) характеризовался сохранением умеренного фиброза и атрофических изменений, уменьшением признаков повреждения и нормализацией некоторых морфометрических показателей: высоты однослойного призматического эпителия и толщины эндометрия. При

Таблица 1

Морфометрические показатели матки крыс при индуцированном некоторыми солями магния патоморфозе алиментарного дефицита магния (M±m)

Морфометрические показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6
Высота однослойного столбчатого эпителия, мкм	35,35 ±1,11	22,57 ±0,58*	30,41 ±0,43*#	41,18 ±0,54#	54,43 ±0,57*#	57,85 ±0,85*#
ОД ядер однослойного столбчатого эпителия, %	30,11 ±4,7	39,20 ±2,83*	46,21 ±2,84*#	43,04 ±1,93*	43,44 ±1,38*#	44,29 ±1,55*#
ОД желез эндометрия, %	46,0 ±1,8	23,0 ±0,1*	41,0 ±0,3*	13,0 ±0,2*#	23,0 ±0,6*	14,0 ±0,3*#
Высота экзокриноцитов желёз, мкм	36,49 ±0,48	16,56 ±0,17*	20,99 ±0,26*#	29,99 ±0,33*#	36,52 ±0,33#	22,25 ±0,47*#
ОД ядер экзокриноцитов желёз, %	37,45 ±1,67	39,42 ±2,75	49,07 ±1,65*#	49,99 ±1,56*#	48,59 ±1,75*#	46,81 ±1,96*
Толщина эндометрия, мкм	915,81 ±22,90	408,11 ±9,76*	832,61 ±22,14#	1231,93 ±38,23*#	967,50 ±24,42#	1136,32 ±43,58#
Толщина миометрия, мкм	561,75 ±7,93	169,96 ±4,27*	706,28 ±11,02*#	682,36 ±21,87#	501,84 ±13,63#	661,69 ±23,58#
Отношение толщины эндометрия к миометрию, число	2,34 ±0,11	2,43 ±0,04	0,88 ±0,10*#	2,33 ±0,11	2,19 ±0,12	1,17 ±0,06*#
Толщина стенки сосудов миометрия, мкм	36,03 ±0,58	33,78 ±0,96	38,34 ±0,47	47,61 ±0,66*	38,09 ±0,47	46,57 ±0,85*

* - $p < 0,05$ по отношению к группе 1 (интактные животные)

- $p < 0,05$ по отношению к группе 2 (животные с алиментарным дефицитом магния)

Таблица 2

Морфометрические показатели яичников крыс при индуцированном некоторыми солями магния патоморфозе алиментарного дефицита магния (M±m)

Морфометрические показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6
Толщина стенки сосудов	21,25 ±0,85	21,51 ±0,38	15,37 ±0,38*#	28,87 ±0,56*#	22,68 ±0,25	29,38 ±0,98*#
Площадь желтых тел, мкм ²	223192,4 ±193,1	222626,02 ±104211,61	191834,35 ±184166,8	194231,09 ±74588,51	223358,54 ±124444,21	385696,71 ±61236,4*
Площадь лютеоцитов, мкм ²	446,95 ±14,35	358,4±8,5*	595,76 ±2,02*#	581,09 ±0,5*#	464,21 ±2,02#	598,15 ±1,36*#
Площадь ядер лютеоцитов, мкм ²	128±3,8	132,72±1,77	130,36 ±2,03	111,58 ±0,92*#	126,5 ±0,96#	131,96 ±1,36

* - $p < 0,05$ по отношению к группе 1 (интактные животные)

- $p < 0,05$ по отношению к группе 2 (животные с алиментарным дефицитом магния)

морфометрическом исследовании достоверное увеличение толщины эндометрия на 34,52% ($p < 0,05$) по сравнению с группой 1, а также снижение высоты экзокриноцитов желёз на 17,81% ($p < 0,05$) рассматривается нами как проявление адаптационных процессов за счет гиперплазии стромальных клеток в эндометрии. Увеличение ОД ядер однослойного призматического эпителия и ОД ядер экзокриноцитов желёз эндометрия на 33,48% ($p < 0,05$) и 42,95% ($p < 0,05$), соответственно, рассматривается нами как проявление влияния аспарагината магния на ядерный аппарат эпителиальных клеток, что может способствовать отсроченному восстановлению эпителиоцитов при данном виде коррекции. Выраженное увеличение толщины стенки спиральных артерий миометрия на 32,13% ($p < 0,05$) свидетельствует о сохранении выраженных десмопластических изменений в сосудах.

В яичниках проявления индуцированного аспарагинатом магния патоморфоза алиментарного дефицита магния были менее выражены и характеризовались нарастанием явлений фиброза в строме яичника и снижением выраженности атрофических изменений в желтых телах, увеличением площади лютеоцитов на 62,13% ($p < 0,05$) и достоверным увеличением толщины сосудистой стенки интраорганных артерий на 35,82% ($p < 0,05$).

При рассмотрении патоморфоза алиментарного дефицита магния, индуцированного хлоридом магния (6-я группа), отмечалась компенсация патологических изменений, возникших при недостатке магния, за счет увеличения толщины эндометрия и миометрия. Так, при морфометрическом анализе наблюдалась нормализация толщины эндометрия и миометрия, относительно группы 1, однако отмечалось снижение отношения эндометрия к миометрию на 50,0% ($p < 0,05$). Адаптационные изменения эпителиоцитов в эндометрии были выражены разнонаправленно: высота однослойного призматического эпителия возрастала на 63,63% ($p < 0,05$), а высота экзокриноцитов желёз эндометрия достоверно снижалась на 39,0% ($p < 0,05$). Увеличение размеров однослойного призматического эпителия на 25,0 % при ($p < 0,05$), также подтверждает усиление метаболической активности эпителия. Состояние сосудистой стенки спиральных артерий миометрия не претерпевало выраженных изменений относительно показателей животных 1-й группы.

В яичниках проявления индуцированного хлоридом магния патоморфоза алиментарного дефицита магния характеризовались сохранением явлений фиброза в строме яичника, так и снижением выраженности атрофических изменений в желтых телах, что сопровождалось увеличением площади лютеоцитов на 66,89% ($p < 0,05$) и увеличением толщины сосудистой стенки интраорганных артерий на 38,25% ($p < 0,05$) по сравнению с крысами группы 1.

Таким образом, наиболее выраженные признаки повреждения при дефиците магния отмечены в эпителиальных клетках эндометрия и эндокринном аппарате яичников, что, по-видимому, связано с более высокой синтетической активностью клеток вышеуказанных тканей. Поскольку в покровном и железистом эпителии эндометрия отмечалось увеличение экспрессии биомаркера TRPM7, механизм обнаруживаемого повреждения реализовался, вероятно, через кальций-зависимые механизмы, благодаря повышению тока Ca^{2+} внутрь клетки через каналы TRPM7 при низкой концентрации ионов магния [Рогова Н.В. и др., 2013; Schlingmann K. P., Gudermann T., 2005]. Индуцированный патоморфоз недостаточности магния характеризуется уменьшением выраженности процессов повреждения, что подтверждается снижением уровней экспрессии биомаркеров TRPM-7 и Вах, неполной регрессией атрофических изменений, сохранением различной степени выраженности фиброза, в яичниках (наиболее выраженного), а также в эндометрии и в миометрии (наименее выраженного). Поскольку степень восстановления повреждённых тканей зависит от выраженности фиброза, баланса матриксных протеиназ, их тканевых ингибиторов, а также ряда других факторов [Eskes R. et al., 1998; Пальцев М.А. и др., 2013], то обнаруживаемое нами возрастание ряда морфометрических показателей элементов паренхимы яичников, эндометрия и миометрия свидетельствует о развитии компенсаторной гиперплазии и формировании неполной регенерации.

ВЫВОДЫ

1. Морфогенез алиментарного дефицита магния у крыс характеризуется преобладанием в слизистой оболочке матки атрофических процессов, регистрируемых во всех фазах эстрального цикла, наиболее выраженных в фазе эструса (снижение толщины эндометрия на 55,44 %, снижение объёмной доли маточных желёз 39,47%, высоты экзокриноцитов желёз на 54,61%), сопровождающихся дистрофическими изменениями в покровном и железистом эпителиях в сочетании с признаками нарушения кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла, увеличением сосудистой проницаемости и развитием периваскулярного отека.

2. Выявленные при патогистологическом исследовании дистрофические изменения в эндометрии у животных с алиментарным дефицитом магния сочетаются с более выраженными признаками апоптоза, которые сопровождаются увеличением уровня экспрессии биомаркёра Вах, преимущественно, в эпителии маточных желёз, что свидетельствует об инициации проапоптозных механизмов в условиях недостатка ионов магния и способствует усилению выраженности процессов повреждения.

3. Иммунофенотип эндометрия у животных с алиментарным дефицитом магния характеризуется снижением экспрессии ингибитора апоптоза биомаркера Vcl-2, что подтверждается изменением ряда морфометрических параметров и максимально выраженным снижением относительной площади иммунореактивного материала на 77,21% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, а также уменьшением отношения уровня экспрессии Vcl-2/Вах на 20,51% ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации апоптоза за счет угнетения цитопротекторных механизмов и способствует прогрессированию атрофических процессов, приводя к снижению толщины эндометрия на 55,44% ($p < 0,05$).

4. При патоморфологическом изучении органов женской репродуктивной системы в условиях экспериментального моделирования алиментарного дефицита магния на протяжении всех фаз эстрального цикла обнаруживаются наиболее выраженные структурные изменения в матке, характеризующиеся активацией десмопластических процессов, в т.ч. образованием коллагеновых волокон в эндометрии, миометрии, особенно в периваскулярных отделах и стенках спиральных артерий в сочетании с

признаками повреждения и атрофии гладких миоцитов, снижением толщины миометрия на 69,75% ($p < 0,05$), как морфологическое проявление адаптационных реакций в гладкой мышечной ткани в ответ на нарушения кровообращения и метаболизма.

5. Обнаруженное при иммуногистохимическом исследовании увеличение уровня экспрессии TRPM7 в эндотелии сосудов микроциркуляторного русла эндометрия, а также в эндотелии и гладких миоцитах спиральных артерий миометрия в условиях моделирования алиментарного дефицита магния свидетельствует о компенсаторном повышении накопления магниевых транспортеров в эндотелиоцитах и гладких миоцитах, что способствует реализации кальцийзависимых механизмов внутриклеточного повреждения.

6. Морфогенез алиментарного дефицита магния характеризуется признаками обратимого и необратимого повреждения в эндокринном аппарате яичников и сопровождается атрофическими изменениями лютеоцитов с уменьшением их площади на 24,71% ($p < 0,05$), развитием обратимых изменений и увеличением уровня апоптоза в желтых телах (увеличение количества Вах-позитивных клеток более чем в 5 раз и снижение индекса апоптоза Bcl-2/Vaх на 53,57% ($p < 0,05$)) и эпителии фолликулов, что сопровождается усилением уровня экспрессии магниевых транспортёров TRPM6, TRPM7 в гормонпродуцирующем аппарате яичников, развитием гемодинамических нарушений и неравномерным склерозированием стенок интраорганных артерий.

7. При индуцированном солями магния патоморфозе алиментарного дефицита магния происходит неполная регрессия атрофических изменений, восстановление ряда морфологических параметров паренхимы матки и яичников, при этом сохраняется обратная зависимость между выраженностью десмопластических процессов и компенсаторной гиперплазией, что свидетельствует о реализации процессов репаративной регенерации на уровне субституции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Продемонстрированные структурные, в т.ч. иммунофенотипические изменения в матке и яичниках, могут служить морфологической основой для диагностики состояний, которые сопровождаются дефицитом магния. Результаты патоморфологического анализа могут быть использованы при проведении дифференциальной диагностики недостаточности магния при исследовании биопсийного и аутопсийного материала, а также при исследовании индуцированного патоморфоза в патологоанатомической практике.

Полученные данные о патоморфологических изменениях в различных отделах женской репродуктивной системы при алиментарном дефиците магния можно использовать в учебном процессе для преподавания патологической анатомии в высших медицинских учебных заведениях. Результаты исследования существенно уточняют характер патоморфологических изменений в органах женской половой системы и могут быть использованы при проведении научно-исследовательских работ при изучении алиментарного дефицита магния.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Структурные изменения некоторых органов крыс при моделировании алиментарного дефицита магния (головной мозг, миокард, яичники, семенники и эндометрий) / А.В. Смирнов, Г.Л. Снигур, М.В. Шмидт, Н.Г. Паньшин, О.Ю. Евсюков, В.А. Толокольников, Т.Ф. Смирнова, Д.В. Буланов, А.А. Спасов, Л.И. Бугаева, М.В. Харитоновна, А.А. Желтова, Т.М. Бундикова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 2012.- № 6.- С. 44-50.**
- 2. Влияние дефицита магния на процесс зачатия и антенатального развития плода (опыты на белых крысах) / А.А. Спасов, Л.И. Бугаева, С.А. Лебедева, М.В. Харитоновна, Т.М. Бундикова, А.В. Смирнов, В.А. Толокольников, О.Ю. Евсюков, А.А. Желтова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 2012.- № 6.- С. 35-38.**
- 3. Патоморфологические изменения матки крыс при алиментарном дефиците магния и его фармакологической коррекции сульфатом магния / А.А. Спасов,**

А.В. Смирнов, Л.И. Бугаева, М.В. Харитонов, С.А. Лебедева, В.А. Толокольников // Волгоградский научно-медицинский журнал.–2012.-№1.-С.112-114.

4. Морфологическая характеристика сосудов миометрия матки крыс в условиях алиментарного дефицита магния и его фармакологической коррекции / В.А. Толокольников, А.А. Спасов, А.В. Смирнов, Л.И. Бугаёва, С.А. Лебедева, Т.М. Бундикова //Ангиология и сосудистая хирургия. Приложение.-2012, Т.18.-С.56-57.

5. Влияние таурината магния на динамику морфометрических показателей матки и яичников крыс при моделировании алиментарной недостаточности магния / В.А. Толокольников, А.В. Смирнов, А.А. Спасов, А.А. Озеров, Л.И. Бугаёва, С.А. Лебедева, В.С. Замараев, Г.Л. Снигур // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. - №4(52). – С. 74-78.

6. Определение эффективности влияния сульфата магния на динамику морфометрических показателей матки и яичников крыс при моделировании алиментарной недостаточности магния / А. А. Спасов, А.В. Смирнов, В.А. Толокольников, Л.И. Бугаёва, С.А. Лебедева // Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2014. - №3(43). – С. 11-15.

7. Сравнительная характеристика патоморфологических изменений матки крыс при развитии дефицита магния в условиях фармакологической коррекции / В.А. Толокольников, А.В. Смирнов, А.А. Спасов, Л.И. Бугаёва, С.А. Лебедева, Л.С. Быхалов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. –№ 3. - URL: www.science-education.ru/123-20076.

8. Патоморфологические изменения матки при развитии алиментарного дефицита магния и в условиях фармакологической коррекции сульфатом и тауринатом магния / В.А. Толокольников // Якутский медицинский журнал. -2015. -№ 2. -С. 86-88.

9. Влияние дефицита магния на поведенческую активность, процессы фертильности и репродуктивные органы крыс-самок / С.А. Лебедева, А.А. Спасов, Л.И. Бугаева, А.В. Смирнов, В.А. Толокольников, Т.М. Бундикова // Микроэлементы в медицине. – 2015. – Т.16, №1. - С. 15–21.

10. Анализ индуцированного различными солями магния патоморфоза алиментарного дефицита магния в матке и яичниках / Толокольников В.А., Спасов А.А., Смирнов А.В., Бугаёва Л.И., Лебедева С.А. // Фармация и фармакология. – 2015. Т.3, Приложение 1. - С. 114-116.