

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНУТРИБРЮШИННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИНТЕРФЕРОНА В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА У КРЫС

Павлов Р.В., Сельков С.А.

Кафедра акушерства и гинекологии Ставропольской государственной медицинской академии,
г. Ставрополь;

Лаборатория иммунологии ГУНИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

Резюме. В статье представлены результаты внутрибрюшинного введения рекомбинантного крысиного α -интерферона 20 крысам линии Wistar с экспериментально моделированным эндометриозом. В качестве критериев эффективности использованного метода лечения оценивались наличие эктопического эндометрия в участках трансплантации маточного рога, пролиферативная активность эндометриоидных клеток, особенности васкуляризации и лейкоцитарной инфильтрации очагов эндометриоза. Авторами показано, что при местном применении α -интерферона регресс эндометриоидных гетеротопий наблюдается в 50% случаев. В случае сохранения эндометриоидного эпителия на фоне применения α -интерферона достоверно снижалась пролиферативная активность его клеток. Во всех трансплантатах у крыс, получавших α -интерферон, наблюдалось снижение степени васкуляризации и увеличение лейкоцитарной инфильтрации за счет лимфоцитов, при одновременном снижении в составе лейкоцитарных инфильтратов количества макрофагов.

Ключевые слова: эндометриоз, лечение, интерферон.

Pavlov R.V., Selkov S.A.

EFFICACY OF INTRAPERITONEAL INTERFERON- α ADMINISTRATION FOR TREATMENT OF ENDOMETRIOSIS IN RATS

Abstract. The article presents the results of intraperitoneal administration of recombinant rat interferon- α to twenty Wistar rats with experimentally induced endometriosis. The following criteria of treatment efficiency were applied: presence of ectopic endometrium in transplanted segments of cornu uteri, proliferative activity of endometrioid cells, features of vascularization and leucocyte infiltration within endometrial foci. It was shown that local application of interferon- α caused regression of endometrioid epithelial heterotopias in 50 per cent of the cases. If endometrioid epithelium was retained, its proliferative activity did significantly drop under interferon- α application. In all transplants derived from rats treated with interferon- α , the degree of vascularization is reduced, accompanied by increased leucocytic infiltration (due to lymphocytes), along with decreased contents of macrophages within leucocytic infiltrates. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 5-6, pp 721-726)

В настоящее время считается, что выживание и имплантация жизнеспособных фрагментов эндомет-

рия в перитонеальной полости во многом обусловлена нарушениями локального иммунного ответа. Исходя из этого предположения рядом исследователей были изучены изменения показателей местного иммунитета, определяющих противоопухолевый иммунный ответ. В частности было показано, что у больных наружным генитальным эндометриозом значительно снижена цитотоксическая активность натуральных киллеров и способность лимфоидных клеток к секреции интерферона [2, 3, 4, 6, 9, 11, 12].

В связи с этим, весьма актуальным представляется изучение селективной стимуляции защитных

Адрес для переписки:

Павлов Роман Владимирович,
Ставропольская государственная медицинская академия, г. Ставрополь, ул. Мира, 310.

Тел.: 32-86-89, 32-34-17.

Сельков Сергей Алексеевич,

Тел.: 230-46-72, 328-98-50.

ГУ НИИИАГ им. Д.О. Отта РАМН,

г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия 3.

функций иммунокомпетентных клеток больных наружным генитальным эндометриозом с использованием препаратов интерферонового ряда. Подобные исследования выполнялись в ряде экспериментальных работ *in vitro*, на животных и в клинических испытаниях на больных женщинах [5, 7, 8, 10]. Однако до сих пор остается до конца не изученной эффективность данного метода лечения и механизм, ведущий к регрессу эндометриoidных гетеротопий при применении интерферонов.

В связи с этим целью нашего исследования явилась оценка эффективности внутрибрюшинного введения α -интерферона в лечении наружного генитального эндометриоза, моделированного в эксперименте на крысах, и изучение возможных механизмов, ведущих к регрессу эндометриoidных гетеротопий при применении этого препарата.

Материалы и методы

Модель экспериментального эндометриоза (ЭЭ) была воспроизведена на 40 крысах-самках линии Wistar, возрастом $6,0 \pm 0,5$ мес. и массой $300,0 \pm 25,0$ г., содержащихся в условиях вивария Ставропольской государственной медицинской академии, путем аутотрансплантации фрагмента левого маточного рога на внутреннюю поверхность передней брюшной стенки таким образом, чтобы эндометрий был обращен в брюшную полость.

Все оперативные вмешательства проводились под наркозом этаминалом натрия в дозе 50 мг/кг. При хирургическом вмешательстве использовались рассасывающиеся нити Biosorb 6,0 («Alcon surgical», США). В течение 10 дней после трансплантации маточного рога крысы содержались в стандартных условиях, получали одинаковый корм и не получали никаких лекарственных препаратов. Через 10 дней после трансплантации маточного рога все животные были разделены на 2 группы.

20 животным I группы в асептических условиях в брюшную полость вводился рекомбинантный, крысинный α -интерферон («Sigma-Aldrich», США), в дозировке 15 000 ЕД на 1 кг (из перерасчета средней дозировки на человека 1 000 000 ЕД), трехкратно, с интервалом через 1 день.

20 животным II группы в асептических условиях в брюшную полость по аналогичной схеме вводился стерильный физиологический раствор.

Через 40 дней от начала эксперимента все животные забивались посредством декапитации, после чего у них оценивали клеточный состав перитонеальной жидкости и гистологическое строение очагов ЭЭ.

Исследование перитонеальной жидкости выполнялось в два этапа. На первом этапе в камере Горяева подсчитывали количество клеток в 1 мл перитонеальной жидкости. На втором этапе готовились

мазки перитонеальной жидкости, в которых после окраски по Романовскому-Гимзе подсчитывали содержание отдельных популяций клеток лимфоцитов, перитонеальных макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток.

Перед проведением гистологического исследования участки ЭЭ фотографировали на цифровую камеру для дальнейшего макроскопического описания и измерения. Учитывался цвет очагов, площадь, наличие на поверхности кистозных образований.

Для оценки пролиферативной активности клеток эпителия эндометриoidных желез и эндотелия сосудов очагов ЭЭ использовались критерии, рекомендованные Г.Г. Автандиловым (1996): площадь ядер, плоидность клеток и активность областей организаторов ядрышек (ОЯОР) [1]. Степень васкуляризации участков ЭЭ оценивали по суммарной площади сосудов и среднему просвету капилляров, а активность ангиогенеза на основании морфологических критериев пролиферации эндотелиальных клеток капилляров.

Для проведения гистологического и гистохимического исследования кусочки очагов ЭЭ фиксировались в 10 % нейтральном формалине и 96 %, охлажденном до 2°C этаноле. На ротационном микротоме «МПС-2» после парафиновой заливки получали срезы толщиной 5-7 мкм.

Для обзорных целей, оценки степени васкуляризации очагов ЭЭ, проведения кариометрии, подсчета основных популяций иммунокомпетентных клеток и оценки активности ОЯОР срезы, полученные из препаратов, фиксированных в 10% нейтральном формалине, окрашивали гематоксилин-эозином, по Романовскому-Гимзе и импрегнировали азотнокислым серебром. Для цитофотометрического изучения закономерностей распределения ДНК в ядрах клеток срезы, полученные из препаратов, фиксированных в 96% охлажденном этаноле, окрашивали акридиновым оранжевым при pH=2,0.

Системный морфометрический анализ удаленных очагов ЭЭ выполняли в нашей модификации с помощью микротелефотометрического анализатора изображения, состоящего из видеокамеры «ВКМ 380», полифункционального микроскопа «ЛЮМА Р-8», блока оцифровки изображения и компьютера PENTIUM III, с использованием программы «ВидеоТест-Морфо» производства ООО «Истра-ВидеоТест» (Россия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Primer Biostatistic 4.03. for Windows». Для всех показателей, полученных у животных основной и контрольной группы, определяли средние значения (М), а также стандартную ошибку среднего (m). Для оценки степени достоверности различий между значениями использовался простой критерий Стьюдента (t). Различия между показателями считали

достоверными при $p \leq 0,05$ и абсолютно достоверными при $p \leq 0,01$.

Результаты

При сравнении макроскопической характеристики участков ЭЭ (рис. 1) обращала на себя внимание выявление участков белого цвета и снижение частоты выявления красных очагов у животных, пролеченных α -интерфероном. Частота выявления коричневых и черных очагов была одинако-

ва в обеих группах животных, однако их размеры были значительно меньше у животных получавших α -интерферон. Частота выявления кист с серозным содержимым на поверхности очагов ЭЭ, как и их диаметр, была одинакова в обеих группах животных.

При обзорной микроскопии у всех животных, не получавших лечение, в участках ЭЭ были выявлены очаги типичного эндометриоидного эпителия, что

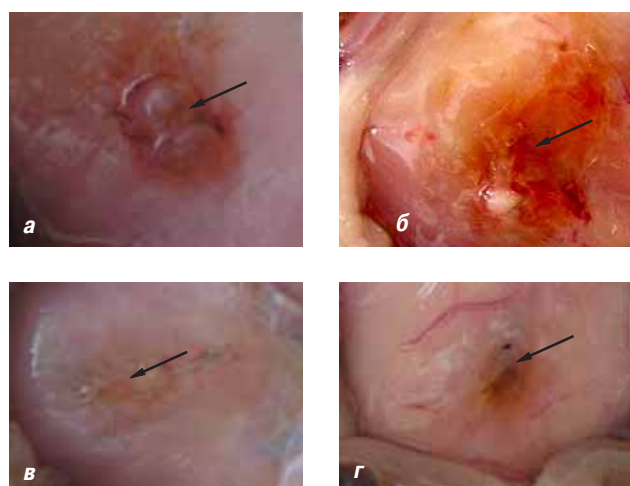


Рис. 1. Макроскопические особенности участков ЭЭ на фоне лечения α -интерфероном: а – красные очаг эндометриоза (контрольная группа); б – коричневый очаг эндометриоза (контрольная группа); в – белый очаг эндометриоза (группа получавшая α -интерферон); г – коричневый очаг эндометриоза (группа получавшая α -интерферон).

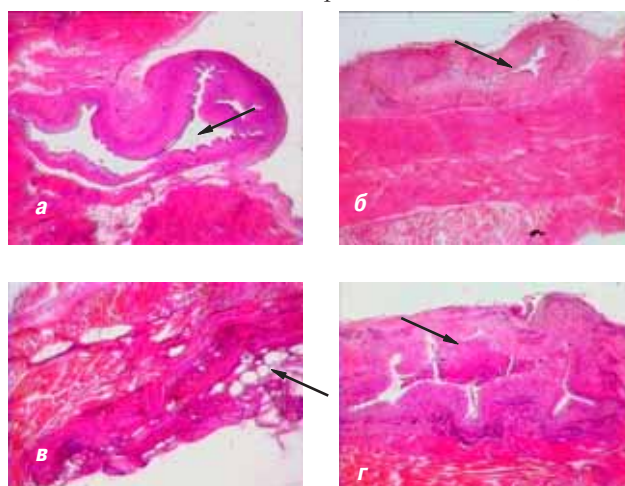


Рис. 2. Микроскопические особенности участков ЭЭ, на фоне лечения α -интерфероном: а – объем трансплантата и площадь эндометриоидной железы (контрольная группа); б – уменьшение объема трансплантата и площади эндометриоидной железы (группа, получавшая α -интерферон); в – мультикистозная трансформация очага эндометриоза (группа получавшая α -интерферон); г – некроз очага эндометриоза (группа получавшая α -интерферон). Окраска: гематоксилином и эозином, $\times 40$.

Табл. 1. ПОКАЗАТЕЛИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИОИДНЫХ ГЕТЕРОТОПИЙ

Показатели	Нелеченные (n=20)	Интерферон (n=10)
1. Объем трансплантата, (мм ³)	130,20±4,78	111,40±6,33 *
2. Площадь железы от площади трансплантата, (%)	11,29±1,94	5,96±1,47 *
3. Высота эпителия, (мкм)	14,10±0,74	10,90±0,86 **
4. Площадь ядер эпителия, (мкм ²)	19,97±0,76	15,00±0,97 ***
5. Пloidность эпителия, (с),	3,35±0,32	2,38±0,13 **
6. Количество ОЯОР в ядре, (шт.)	2,63±0,16	2,10±0,12 *
7. Средняя площадь ОЯОР, (мкм ²)	1,61±0,09	1,36±0,08 *
8. Суммарная площадь ОЯОР в ядре, (мкм ²)	3,17±0,32	2,42±0,08 *

Примечание: достоверность различий между контрольной и основной группами: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Табл. 2. ОСОБЕННОСТИ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ЭНДОМЕТРИОИДНЫХ ГЕТЕРОТОПИЙ

Показатели	Нелеченные (n=20)	Интерферон (n=20)
1. Площадь просвета сосудов от площади трансплантата, (%)	10,79±0,70	8,00±1,00 *
2. Средний просвет капилляра, (мкм ²)	107,97±9,73	63,38±5,53 ***
3. Площадь ядер эпителия, (мкм ²)	10,33±0,54	7,91±0,41 ***
4. Пloidность эпителия, (с),	2,28±0,09	2,02±0,06 *
5. Количество ОЯОР в ядре, (шт.)	1,98±0,11	1,77±0,18
6. Средняя площадь ОЯОР, (мкм ²)	0,74±0,09	0,54±0,04 *
7. Суммарная площадь ОЯОР в ядре, (мкм ²)	1,35±0,08	0,83±0,05 ***

Примечание: достоверность различий между контрольной и основной группами: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Табл. 3. КЛЕТочный СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ИНФИЛЬТРАТОВ ЭНДОМЕТРИОИДНЫХ ГЕТЕРОТОПИЙ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Показатели	Нелеченные (n=20)	Интерферон (n=20)
I. Лейкоцитарные инфильтраты		
1. Лейкоциты в 1 мм ²	1863,00 ± 359,00	4932,00 ± 396,80 ***
2. Нейтрофилы (%)	3,36 ± 0,92	3,18 ± 0,32
3. Тучные клетки (%)	3,01 ± 0,58	1,54 ± 0,40 *
4. Макрофаги (%)	2,00 ± 0,25	1,29 ± 0,14 *
5. Лимфоциты (%)	91,69 ± 3,95	93,99 ± 1,37
II. Перитонеальная жидкость		
1. Лейкоциты, в 1 мл	174,23 ± 13,75	121,50 ± 13,22 **
2. Нейтрофилы (%)	14,32 ± 0,67	11,72 ± 0,62 **
3. Тучные клетки (%)	6,33 ± 0,41	3,78 ± 0,29 ***
4. Макрофаги (%)	33,61 ± 1,16	28,62 ± 0,84 ***
5. Лимфоциты (%)	45,74 ± 0,69	55,88 ± 1,08 ***

Примечание: достоверность различий между контрольной и основной группами: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

позволило нам сделать вывод о развитии экспериментального эндометриоза в 100 % случаев. На фоне лечения α -интерфероном у 10 крыс (50,0±11,2 %) в области ЭЭ эктопический эндометрий отсутствовал, что позволило нам сделать вывод о регрессе эндометриоидных гетеротопий у этих животных. При этом у 2 крыс наблюдался некроз очага ЭЭ, у 3 - его мультикистозная дегенерация и у 5 - участок ЭЭ полностью заместился грануляционной тканью (рис. 2).

В процессе морфометрической оценки нами было

установлено, что объем очагов ЭЭ и площадь сохранившихся эндометриоидных желез у животных, пролеченных α -интерфероном, была достоверно ниже, чем у крыс, не получавших лечение (рис. 2). Кроме этого при оценке площади ядер, высоты эпителия, плоидности клеток эктопического эндометрия и активности в их ядрах ОЯОР (рис. 3) нами было установлено достоверное уменьшение всех параметров, отражающих пролиферативную активность эпителиальных клеток в очагах ЭЭ у крыс, получавших

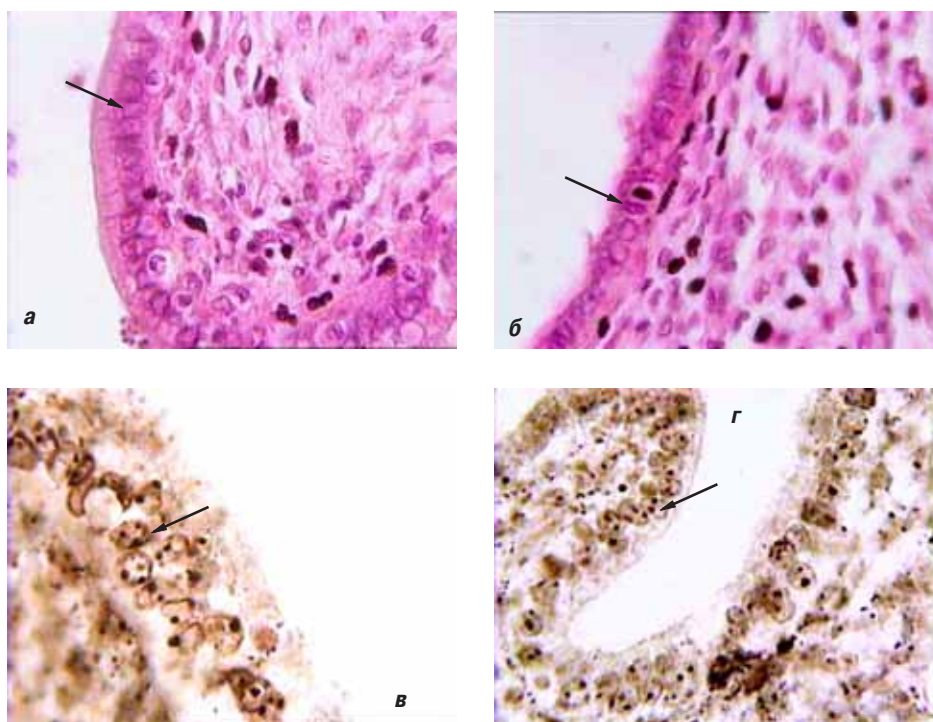


Рис. 3. Показатели пролиферативной активности клеток эктопического эндометрия на фоне лечения α -интерфероном: а – площадь ядер и высота клеток эктопического эндометрия (контрольная группа); б – уменьшение площади ядер и высоты клеток эктопического эндометрия (группа получавшая α -интерферон), окраска гематоксилином и эозином, x 600; в – активность ОЯОР в ядрах клеток эктопического эндометрия (контрольная группа); г – уменьшение активности ОЯОР в ядрах клеток эктопического эндометрия (группа, получавшая α -интерферон), окраска азотнокислым серебром, x 1000.

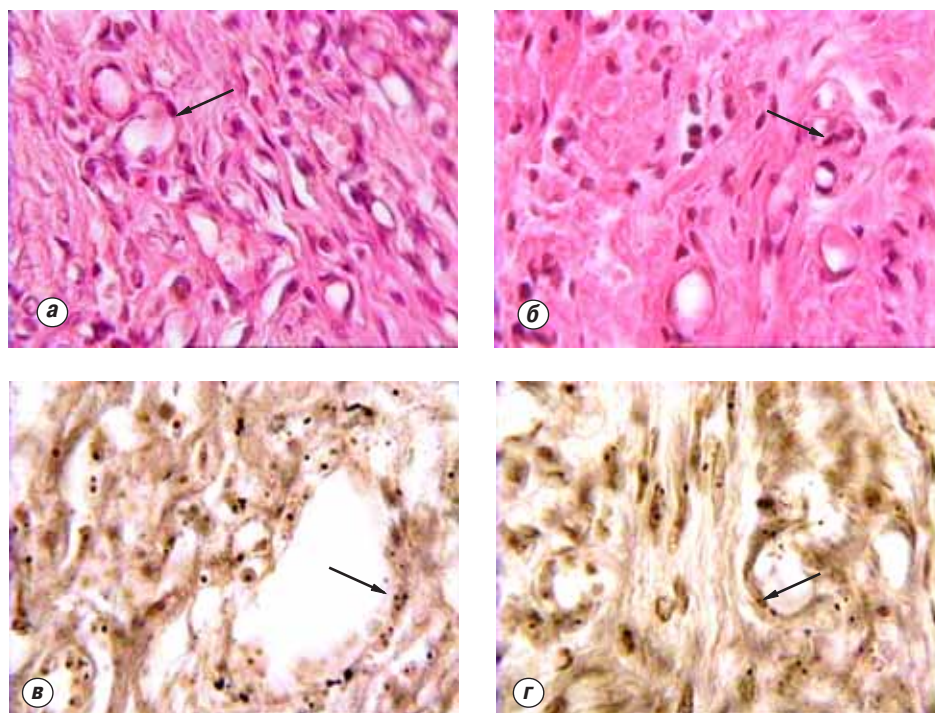


Рис. 4. Степень васкуляризации очагов эндометриоза и активность ОЯОР в ядрах эндотелиальных клеток, на фоне лечения α -интерфероном: а – диаметр капилляров и площадь ядер эндотелиальных клеток (контрольная группа); б – уменьшение диаметра капилляров и площади ядер эндотелиальных клеток в очаге эндометриоза (группа, получавшая α -интерферон), окраска гематоксилином и эозином, $\times 600$; в – активность ОЯОР в ядрах клеток эндотелия в очаге эндометриоза (контрольная группа); г – уменьшение активности ОЯОР в ядрах клеток эндотелия в очаге эндометриоза (группа, получавшая α -интерферон), окраска азотнокислым серебром, $\times 1000$.

α -интерферон (табл. 1).

При анализе степени васкуляризации очагов ЭЭ (рис. 4) нами было установлено достоверное снижение суммарной площади сосудистого русла, средней площади просвета капилляров, площади ядер эндотелиальных клеток, их плоидности и активности ОЯОР в ядрах эндотелиальных клеток у животных, получавших лечение α -интерфероном (табл. 2).

Изучение особенностей лейкоцитарной инфильтрации ЭЭ (табл. 3) показало резкое возрастание ее интенсивности на фоне применения α -интерферона. При этом в очагах ЭЭ не только увеличивалось интенсивность лейкоцитарной инфильтрации, но и менялся ее качественный состав в сторону достоверного роста количества лимфоцитов и снижения числа макрофагов, тучных клеток и нейтрофилов.

При сравнении перитонеального микроокружения у животных, получавших и не получавших лечение, нами было установлено снижение клеточности перитонеальной жидкости при применении α -интерферона. При этом в перитонеальной жидкости на фоне применения α -интерферона не только снижалось количество свободных клеток, но и менялся их качественный состав в сторону снижения содержания тучных клеток, макрофагов и нейтрофилов и увеличения количества лимфоцитов (табл. 3).

Обсуждение

Анализируя представленные данные, можно констатировать, что на фоне внутрибрюшинного введения α -интерферона полный регресс очагов ЭЭ наблюдался у 50 % лабораторных животных. В случае сохранения эндометриозных желез отмечалось достоверное уменьшение их объема, а также снижение пролиферативной активности клеток эктопического эндометрия. Полученные данные показывают, что можно предположить, что возможным механизмом действия α -интерферона в регрессе ЭЭ является увеличение активности лимфоцитов, инфильтрирующих очаги эндометриоза и обладающих прямым цитотоксическим действием на клетки эктопического эндометрия, при одновременном снижении в лейкоцитарных инфильтратах количества макрофагов, инициирующих процесс ангиогенеза, о чем свидетельствуют и литературные данные. Дополнительным подтверждением этого предположения можно считать снижение степени васкуляризации очагов ЭЭ и уменьшение активности эндотелиальных клеток на фоне применения α -интерферона. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие отрицательного системного действия внутрибрюшинного введения α -интерферона, используемая методика имела местный побочный эффект в виде некроза участка ЭЭ с образованием гнойника у 10 % лабораторных животных.

Нужно также отметить, что достаточно скромный эффект α -интерферона, наблюдавшийся только

у 50 % животных, связан со сравнительно кратковременным введением препарата. В то же время известно, что терапевтические эффекты интерферонов как при опухолевых заболеваниях, так и при хронических вирусных инфекциях наступают длительно, иногда многомесячного введения. Вероятно, эндометриоз, будучи хроническим процессом, также требует более длительной интерферонотерапии.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Компьютерная микротелефотометрия в диагностической гистопатологии. – М.: РМАПО, 1996. – 256 с.
2. Махмудова Г.М., Попов А.В. Роль некоторых факторов перитонеальной жидкости в патогенезе эндометриоза // Российский вестник акушера-гинеколога – 2004. – №2. – с. 27-30.
3. Сельков С.А., Ярмолинская М.И., Григорьева В.В., Аникин В.Б., Ариненко Р.Ю., Селютин А.В. Состояние антипролиферативных механизмов иммунной системы при наружном генитальном эндометриозе // Вестник Российской ассоциации акушеров и гинекологов. – 1997. – №3. – С. 40-43.
4. Сельков С.А., Крамарева Н.Л., Павлов О.В., Ярмолинская М.И. Локальная продукция цитокинов у пациенток с наружным генитальным эндометриозом // Журнал акушерства и женских болезней – 2002. – Т. LI. – В. 3 – С. 57-62.
5. Ярмолинская М.И. Роль антипролиферативных компонентов иммунной системы в патогенезе и выборе терапии наружного генитального эндометриоза: Автореф. Дис....канд. мед. Наук. – СПб.: Б.и., 1997.
6. Ярмолинская М.И., Григорьева В.В., Аникин В.Б., Абашова Е.И., Сельков С.А. Система интерферонов и цитотоксических клеток в регуляции пролиферативных процессов при эндометриозе // Иммунология репродукции. – 2004. – Том 6. – №3-5. – С.394-395.
7. Badawy S.Z., Etman A., Cuenca V., Montante A., Kaufman L. Effect of interferon alpha-2b on endometrioma cells in vitro // Obstet. Gynecol. – 2001. – Vol.98. – N3. – P. 417-420.
8. D'Hooghe T.M. Immunomodulators and aromatase inhibitors: are they the next generation of treatment for endometriosis? // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 2003. – Vol.15. – N3. – P.243-249.
9. Ho H.N., Wu M.Y., Yang Y.S. Peritoneal cellular immunity and endometriosis // Am. J. Reprod. Immunol. – 1997. – Vol.38. – N6. – P. 400-412.
10. Ingelmo J.M., Quereda F., Acien P. Intraperitoneal and subcutaneous treatment of experimental endometriosis with recombinant human interferon-alpha-2b in a murine model // Fertil. Steril. – 1999. – Vol.71, N5. – P.907-911.
11. Maeda N., Izumiya C., Yamamoto Y., Oguri H., Kusume T., Fukaya T., Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis // Fertil. Steril. – 2002. – Vol. 77. – №2. – P. 297-302.
12. Szylo K., Tchorzewski H., Banasik M., Glowacka E., Lewkowicz P., Kamer-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis // Mediators Inflamm. – 2003. – Vol.12. – N3. – P.131-138.

поступила в редакцию 23.05.2006
отправлена на доработку 20.06.2006
принята к печати 28.06.2006