

УДК 611.451:59.085+615.37
doi:10.21685/2072-3032-2022-4-7

Морфогенез матки и динамика цитокинового профиля плазмы крови крыс репродуктивного периода при коррекции имунофаном метотрексат-индуцированной иммуносупрессии

С. Н. Семенчук¹, С. А. Кашченко²

^{1,2}Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки,
Луганск, Россия

¹s.semenchuk.lgmu@mail.ru, ²kashchenko_s@list.ru

Аннотация. *Актуальность и цели.* Цель исследования – изучение морфогенеза матки и динамики цитокинового профиля крыс молодого возраста репродуктивного периода при коррекции имунофаном метотрексат-индуцированной иммуносупрессии. *Материалы и методы.* Исследование выполнено на 60 белых беспородных половозрелых крысах-самках массой 210–250 г. После синхронизации эстральных циклов животные были разделены на две группы. Иммуносупрессию моделировали введением лабораторным животным метотрексата в дозировке 10 мг/м² площади тела в начале диэструса с последующей коррекцией путем внутримышечной инъекции иммуномодулирующего средства имунофан в дозировке 50 мкг по схеме. Крыс выводили из эксперимента в фазу проэструса 1, 3, 5, 7 и 9-го эстральных циклов, измеряли абсолютную и относительную массу матки, линейные характеристики ее тела и рогов, объем органа. На светооптическом уровне определяли микроморфометрические параметры. Для установления особенностей состояния иммунной системы определяли содержание медиаторов межклеточного взаимодействия IL-1β, IL-2, IL-6 и TNFα в плазме крови животных. *Результаты.* Установлено, что изучаемое воздействие оказывает выраженный эффект на морфометрические параметры матки белых беспородных крыс-самок молодого возраста репродуктивного периода, а также сопровождается статистически значимыми изменениями цитокинового профиля животных. *Выводы.* Полученные результаты свидетельствуют о благоприятном эффекте имунофана на динамику морфометрических параметров матки половозрелых животных в качестве корректора острой иммуносупрессии.

Ключевые слова: метотрексат, имунофан, матка, иммуносупрессия, крысы

Для цитирования: Семенчук С. Н., Кашченко С. А. Морфогенез матки и динамика цитокинового профиля плазмы крови крыс репродуктивного периода при коррекции имунофаном метотрексат-индуцированной иммуносупрессии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2022. № 4. С. 66–73. doi:10.21685/2072-3032-2022-4-7

Uterine morphogenesis and dynamics of the cytokine profile of the blood plasma of the reproductive period rats at correcting of methotrexate-induced immunosuppression with imunofan

S.N. Semenchuk¹, S.A. Kashchenko²

^{1,2} Saint Luka Lugansk State Medical University, Lugansk, Russia

¹s.semenchuk.lgmu@mail.ru, ²kashchenko_s@list.ru

Abstract. *Background.* The purpose of the work is to study uterine morphogenesis and dynamics of the cytokine profile of the blood plasma of the reproductive period rats at correcting of methotrexate-induced immunosuppression with imunofan. *Materials and methods.* The study was carried out on 60 white mongrel mature female rats weighing 210-250 g. After synchronizing the estrous cycles, the animals were divided into 2 groups. Immunosuppression was modeled by administration of methotrexate to laboratory animals at a dosage of 10 mg/m² of body area at the beginning of diestrus, followed by correction by intramuscular injection of the immunomodulatory agent imunofan at a dosage of 50 µg according to the scheme. Rats were taken out of the experiment into the proestrus phase (PE) of the 1st, 3rd, 5th, 7th and 9th estrous cycles, the absolute and relative mass of the uterus, the linear characteristics of its body and horns, and the volume of the organ were measured. Micromorphometric parameters were determined at the light-optical level. To establish the characteristics of the state of the immune system, the content of mediators of intercellular interaction IL-1β, IL-2, IL-6 and TNFα in the blood plasma of animals was determined. *Results.* It was found out that the studied influence has a pronounced effect on the morphometric parameters of the uterus of white mongrel female rats of young reproductive age, and is also accompanied by statistically significant changes in the cytokine profile of animals. *Conclusions.* The results obtained indicate a favorable effect of imunofan on the dynamics of morphometric parameters of the uterus of mature animals as a corrector of acute immunosuppression.

Keywords: methotrexate, imunofan, uterus, immunosuppression, rats

For citation: Semenchuk S.N., Kashchenko S.A. Uterine morphogenesis and dynamics of the cytokine profile of the blood plasma of the reproductive period rats at correcting of methotrexate-induced immunosuppression with imunofan. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki = University proceedings. Volga region. Medical sciences.* 2022;(4):66–73. (In Russ.). doi:10.21685/2072-3032-2022-4-7

Введение

В регуляции нормальной деятельности органов женской репродуктивной системы большую роль играет состояние локального и общего иммунитета. Их кооперация осуществляется множеством механизмов, основными из которых являются гуморальные взаимодействия посредством продукции гормонов и различных компонентов цитокинового профиля [1, 2]. В последние десятилетия в регионах с развитой угольной, металлургической и химической промышленностью увеличивается число вторичных заболеваний иммунной системы, которые сопровождаются выраженной дезорганизацией взаимодействий между высокоспециализированными звеньями иммунитета и эндокринной системы. Данные множества исследований указывают на роль реактивности иммунитета в структуре патогенеза как воспалительных, так и опухолевых нозологий гинекологического спектра, приводящих к росту бесплодия среди женского населения, что следует расценивать как важнейшую экономическую, демографическую и социальную проблему развитых стран. Следовательно, поиск механизмов восстановления нарушенного иммунного гомеостаза является важной научной задачей не только для фундаментальных, но и для прикладных клинических наук.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение морфогенеза матки и динамики цитокинового профиля крыс молодого возраста репродуктивного периода при коррекции имунофаном метотрексат-индуцированной иммуносупрессии.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 60 белых беспородных половозрелых крысах-самках массой 210–250 г. На первом этапе исследования после синхронизации эстральных циклов животные были разделены на две группы. Иммуносупрессию моделировали введением лабораторным животным метотрексата в дозировке 10 мг/м² площади тела в начале диэструса. Коррекцию проводили путем внутримышечной инъекции иммуномодулирующего средства имунофан в дозировке 50 мкг по схеме на 1, 3, 5, 7 и 9-е сут после введения метотрексата [3]. Крысы контрольной группы получали 0,9 % раствор NaCl в эквивалентном объеме. Оценка фаз эстрального цикла (проэструс, эструс, метэструс и диэструс) проводили на основе гистологического изучения влажных мазков. Животных выводили из эксперимента в фазу проэструса (ПЭ) 1, 3, 5, 7 и 9-го эстральных циклов с соблюдением требований «Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных» (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press. USA. 2011).

Матку выделяли брюшным доступом, отделяли жировую ткань и выполняли органомерию. Измеряли абсолютную и относительную массу органа, линейные характеристики тела (высоту, ширину и толщину), длину правого и левого рогов, их диаметр. Объем матки определяли методом вытеснения дистиллированной воды в градуированном цилиндре. После фиксации исследуемый материал промывали в проточной воде и подвергали стандартной гистологической проводке. Полученные срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и железным гематоксилин-пикрофуксином по Ван Гизону. Микрофотографии получали с помощью морфометрического комплекса на базе микроскопа Olympus CX-41. Микроморфометрические измерения объектов проводили путем загрузки полученных цифровых изображений в компьютерную программу АСКОН «Компас-3D 17.0» с калибровкой при помощи фотографий объект-микрометра в аналогичных режимах съемки. На светооптическом уровне определяли толщину эндометрия и миометрия, а также их соотношение, высоту и площадь призматических эпителиоцитов эндометрия и их ядер с последующим расчетом ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО). Измеряли высоту и площадь экзокриноцитов маточных желез, их ядер, рассчитывали ЯЦО и удельную долю желез эндометрия.

Для установления особенностей состояния иммунной системы определяли содержание медиаторов межклеточного взаимодействия *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6* и *TNF α* в плазме крови животных методом иммуноферментного анализа с помощью наборов Rat Elisa Kit.

Полученные данные обрабатывали с использованием программных возможностей Microsoft Office Excel v. 10.0 и StatSoft Statistica v. 6.0. Применялись методы параметрической статистики, так как использование критерия Шапиро – Уилка позволило установить нормальное распределение показателей в выборке. Достоверность различий между данными экспериментальных и контрольных групп определяли с помощью критерия Стьюдента – Фишера с вероятностью ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение метотрексата с последующим применением имунофана сопровождалось значительными разнонаправленными сдвигами всех органомерических параметров органа начиная с ПЭ 3-го эстрального цикла. Так,

в данный срок наблюдения отмечалось уменьшение абсолютной массы матки на 10,62 %, относительной массы и объема на 11,37 и 32,82 % соответственно. В ПЭ 5-го цикла отмечалась тенденция к некоторому снижению различий, но указанные параметры оставались статистически значимо ниже результатов, полученных в группе контрольных животных на 8,23 % (абсолютная масса), 11,92 % (относительная масса) и 21,14 % (объем). В конце наблюдений (7-й, 9-й ПЭ) различия нивелировались. Динамика линейных параметров тела и рогов матки представлена в табл. 1.

Таблица 1

Линейные параметры матки животных
экспериментальной и контрольной групп

Параметр, мм		Срок наблюдения				
		1-й ПЭ	3-й ПЭ	5-й ПЭ	7-й ПЭ	9-й ПЭ
Длина тела	Экс	3,33 ± 0,10	3,07 ± 0,06*	3,11 ± 0,12*	3,32 ± 0,07	3,29 ± 0,07
	Кон	3,25 ± 0,14	3,34 ± 0,07	3,27 ± 0,08	3,34 ± 0,11	3,40 ± 0,09
Ширина тела	Экс	4,50 ± 0,20	4,50 ± 0,16*	4,77 ± 0,11*	5,03 ± 0,16	5,17 ± 0,20
	Кон	4,96 ± 0,17	5,14 ± 0,18	5,20 ± 0,13	5,26 ± 0,18	5,04 ± 0,12
Толщина тела	Экс	2,97 ± 0,14	2,77 ± 0,12*	2,93 ± 0,10*	3,10 ± 0,05	3,18 ± 0,12
	Кон	3,05 ± 0,13	3,16 ± 0,09	3,20 ± 0,15	3,23 ± 0,04	3,10 ± 0,13
Длина рога	Экс	28,67 ± 0,67	27,08 ± 0,73*	28,83 ± 1,15*	32,25 ± 0,89	32,71 ± 0,84
	Кон	27,09 ± 0,83	31,20 ± 1,21	30,80 ± 0,95	31,20 ± 0,74	34,10 ± 1,19
Диаметр рога	Экс	2,25 ± 0,10	2,28 ± 0,08*	2,38 ± 0,04*	2,52 ± 0,08	2,58 ± 0,10
	Кон	2,48 ± 0,06	2,57 ± 0,14	2,6 ± 0,05	2,63 ± 0,07	2,52 ± 0,07

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем; Экс – экспериментальная группа, Кон – контрольная группа.

На светооптическом уровне матка крыс опытных животных сохраняла типичные черты строения, характерные для контрольной группы [4]. В единичных призматических экзокриноцитах эндометрия были выявлены признаки перинуклеарной вакуолизации (рис. 1).

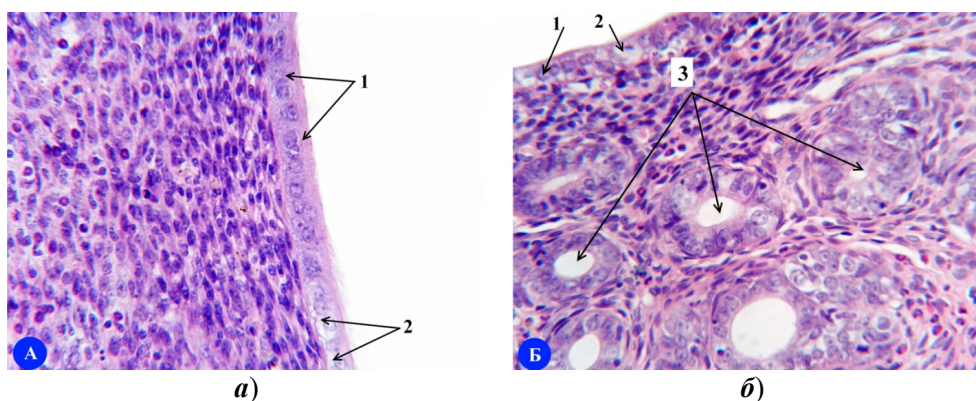


Рис. 1. Фрагмент матки крысы при коррекции метотрексат-индуцированной иммуносупрессии. Окраска: гематоксилин-эозин. Приближение: Zoom 17,5. Объектив: PlanC N 40x/0.655 ∞/0,17/FN221: **а** – 3 ПЭ; **б** – 5 ПЭ: 1 – эпителий эндометрия; 2 – клетки с перинуклеарной вакуолизацией; 3 – маточные железы

При проведении статистического анализа гистоморфометрических параметров установлено, что они согласуются с данными органомерии. Отмечено снижение толщины эндометрия на 12,63 % (3-й ПЭ) с последующим уменьшением до 10,11 % (5-й ПЭ). Также выявлена отрицательная динамика микроморфометрических параметров маточных желез. Установлено снижение их удельной доли в эндометрии на 15,77 % (3-й ПЭ) и 12,05 % (5-й ПЭ). Выявлено снижение индекса эндометрий/миометрий на 8,61 и 9,26 % (3-й и 5-й ПЭ соответственно), вероятно, за счет более высокой пролиферативной активности первого. В то же время нормализация цитоморфометрических характеристик клеток призматического эпителия эндометрия и экзокриноцитов маточных желез наступала раньше, чем нивелирование всех макроморфометрических параметров, уже к проэструсу 5-го эстрального цикла (рис. 2).

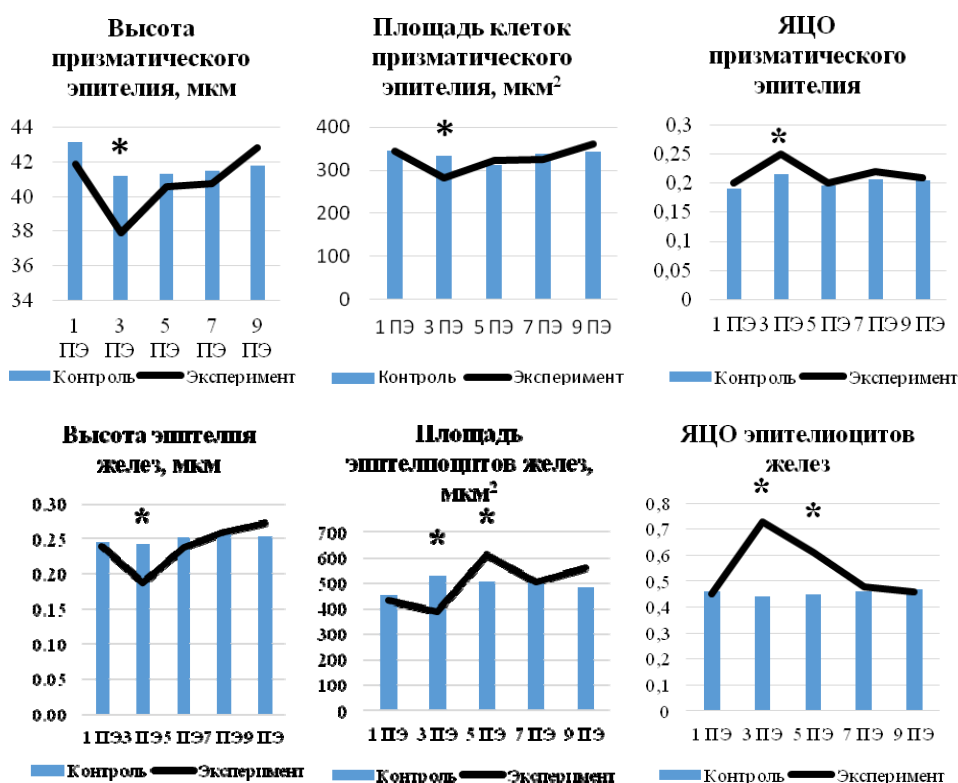


Рис. 2. Некоторые цитоморфометрические параметры матки крыс экспериментальной и контрольной групп; * < 0,05 в сравнении с контролем

В результате проведенного исследования было установлено, что наиболее выраженная динамика изменений цитокинового профиля крыс отмечалась в ПЭ 3, 5 и 7-го эстральных циклов. При этом она имела обратимый характер. Так, концентрация *IL-1β* и *IL-6* снижалась на 10,56 и 8,79 % соответственно ПЭ 3-го цикла. В ПЭ 5-го эстрального цикла отмечалась тенденция к уменьшению статистически значимых различий этих параметров в сравнении с контрольными данными и составила 6,64 и 6,61 %. В поздние сроки наблюдения (7-й и 9-й ПЭ) отмечалось полное нивелирование этих измене-

ний, что соответствовало медленной фазе действия препарата. Динамика *IL-2* и *TNF α* имела сходную направленность и представлена в табл. 2.

Таблица 2

Концентрация *IL-2* и *TNF α* в плазме крови
животных экспериментальной и контрольной групп

Срок наблюдения	<i>IL-2</i> (пг/мл)		<i>TNFα</i> (пг/мл)	
	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	Контроль
1-й ПЭ	60,73 $\pm$ 1,69	61,42 $\pm$ 1,43	11,35 $\pm$ 0,31	11,63 $\pm$ 0,42
3-й ПЭ	57,67 $\pm$ 0,78*	65,41 $\pm$ 1,37	9,91 $\pm$ 0,25*	10,87 $\pm$ 0,31
5-й ПЭ	58,50 $\pm$ 2,38*	63,24 $\pm$ 0,98	11,12 $\pm$ 0,40	11,51 $\pm$ 0,63
7-й ПЭ	68,44 $\pm$ 1,83	67,37 $\pm$ 2,10	12,63 $\pm$ 0,57	12,07 $\pm$ 0,51
9-й ПЭ	70,67 $\pm$ 1,57	68,22 $\pm$ 1,46	12,33 $\pm$ 0,46	10,95 $\pm$ 0,28

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Благоприятный эффект имунофана на содержание цитокинов в плазме крови человека описан Б. И. Кузником и соавторами (2012) в случае острого системного воспалительного процесса [5]. Н. А. Абдрахимова и соавторы (2015) отмечали нормализующий эффект имунофана на концентрацию *IL-1 β* при микробной экземе [6]. По-видимому, основной механизм влияния препарата на морфофункциональную организацию органов женской половой системы связан с его свойством изменять синтез и содержание в цитоплазме иммунокомпетентных клеток (ИКК) вторичных мессенджеров (цАМФ, инозит-1,4,5-трифосфат и диацилглицерина) с последующей передачей сигнала на различные индукторы. Имунофан как синтетический аналог тимических пептидов приводит к активации синтеза *PgE*, действие которого реализуется через цГМФ. Таким образом, изменяя в клетках соотношение цГМФ/цАМФ, препарат способен регулировать процессы пролиферации и дифференцировки ИКК. В то же время известно, что ИКК вместе с эпителиоцитами секретирует большое количество цитокинов (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* , *G-CSF*, *MIP-1 α* и многие другие), которые участвуют в регуляции фолликулогенеза и процесса овуляции благодаря ауто- и паракринным механизмам, тем самым изменяя гормональную активность яичников [7, 8].

Положительный эффект имунофана на продукцию и секрецию гормонов центральными и периферическими органами эндокринной системы также был установлен в ходе изучения его влияние на базофилы гипофиза. В исследовании доказано наличие сильной положительной корреляционной связи между морфологическими элементами эндокринной и иммунной систем, что, вероятно и отражается на морфогенезе органов женской репродуктивной системы [3]. Из полученных результатов следует, что имунофан оказывает выраженный эффект на морфоструктуру матки при иммуносупрессии, вызванной введением метотрексата, это проявляется в более ранней нормализации изученных параметров в сравнении аналогичными параметрами животных, подвергавшихся иммуносупрессии без последующей коррекции [4].

Заключение

Введение метотрексата в дозе 10 мг/м² площади тела с последующим курсовым применением имунофана в дозировке 50 мкг оказывает выражен-

ный эффект на морфометрические параметры матки белых беспородных крыс-самок молодого возраста репродуктивного периода.

Статистически значимые отличия органомерических параметров матки, а также толщины эндометрия от контрольных значений отмечены в проэструсе 3-го и 5-го эстральных циклов после введения иммуносупрессора и иммуномодулятора.

Изучаемое воздействие сопровождается выраженной динамикой концентрации медиаторов межклеточного взаимодействия в плазме крови животных.

Список литературы

1. Carlock C, Wu J, Zhou C. [et al.]. Ovarian phagocyte subsets and their distinct tissue distribution patterns // *Reproduction*. 2013. Vol. 146, № 5. P. 491–500. doi:10.1530/rep-13-0134
2. Ye H., Li X., Zheng T. [et al.]. The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germline stem cells // *Springerplus*. 2016. № 5 (1). doi:10.1186/s40064-016-2390-3
3. Бобрышева И. В. Особенности структурной перестройки тиротропных эндокриноцитов аденогипофиза после экспериментальной иммуностимуляции // *Морфология*. 2012. Т. VI, № 4. С. 22–28.
4. Кашенко С. А., Семенчук С. Н. Влияние метотрексата на матку крыс молодого возраста репродуктивного периода // *Морфологический альманах имени В. Г. Ковешникова*. 2021. № 2. С. 47–52.
5. Кузник Б. И., Цыбиков М. Н., Лиханов И. Д. Действие имунофана на уровень провоспалительных цитокинов и показатели системной воспалительной реакции у больных с острым гнойным перитонитом // *Анналы хирургии*. 2012. № 3. С. 30–33.
6. Абдрахимова Н. А., Хисматуллина З. Р., Надырченко Р. М. Влияние комплексной терапии с иммуномодулятором «Имунофан» на качество жизни больных микробной экземой // *Вестник современной клинической медицины*. 2015. № 1. С. 7–10.
7. Останин А. А., Айзикович Б. И., Айзикович И. В. [и др.]. Роль цитокинов в регуляции репродуктивной функции // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2007. Т. 143, № 1. С. 75–79.
8. Wu R., Hoek K. H., Ryan N. K. [et al.]. Macrophage contributions to ovarian function // *Hum Reprod Update*. 2004. Vol. 10, № 2. P. 119–133. doi:10.1093/humupd/dmh011

References

1. Carlock C, Wu J, Zhou C. et al. Ovarian phagocyte subsets and their distinct tissue distribution patterns. *Reproduction*. 2013;146(5):491–500. doi:10.1530/rep-13-0134
2. Ye H., Li X., Zheng T. et al. The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germline stem cells. *Springerplus*. 2016;(5). doi:10.1186/s40064-016-2390-3
3. Bobrysheva I.V. Features of the structural rearrangement of thyrotropic endocrinocytes of the adenohypophysis after experimental immunostimulation. *Morfologiya = Morphology*. 2012;VI(4):22–28. (In Russ.)
4. Kashchenko S.A., Semenchuk S.N. The effect of methotrexate on the uterus of young rats of the reproductive period. *Morfologicheskiy al'manakh imeni V.G. Koveshnikova = Morphological almanac named after V.G. Koveshnikov*. 2021;(2):47–52. (In Russ.)
5. Kuznik B.I., Tsybikov M.N., Likhanov I.D. The effect of imunofan on the level of pro-inflammatory cytokines and indicators of systemic inflammatory response in patients with acute purulent peritonitis. *Annaly khirurgii = Annals of surgery*. 2012;(3):30–33. (In Russ.)

6. Abdrakhimova N.A., Khismatullina Z.R., Nadyrchenko R.M. The effect of complex therapy with the immunomodulator “Imunofan” on the quality of life of patients with microbial eczema. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of modern clinical medicine*. 2015;(1):7–10. (In Russ.)
7. Ostanin A.A., Ayzikovich B.I., Ayzikovich I.V. et al. The role of cytokines in the regulation of reproductive function. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of experimental biology and medicine*. 2007;143(1):75–79. (In Russ.)
8. Wu R., Hoek K.H., Ryan N.K. et al. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):119–133. doi:10.1093/humupd/dmh011

Информация об авторах / Information about the authors

Сергей Николаевич Семенчук

кандидат медицинских наук, доцент
кафедры гистологии, цитологии
и эмбриологии, Луганский
государственный медицинский
университет имени Святителя Луки
(Россия, г. Луганск, кв. 50-летия
Обороны Луганска, 1г)

E-mail: s.semenchuk.lgmu@mail.ru

Sergey N. Semenchuk

Candidate of medical sciences, associate
professor of the sub-department
of histology, cytology and embryology,
Saint Luka Lugansk State Medical
University (1g 50-letiya Oborony
Luganska square, Lugansk, Russia)

Светлана Аркадьевна Кащенко

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой гистологии,
цитологии и эмбриологии, Луганский
государственный медицинский
университет имени Святителя Луки
(Россия, г. Луганск, кв. 50-летия
Обороны Луганска, 1г)

E-mail: kashchenko_s@list.ru

Svetlana A. Kashchenko

Doctor of medical sciences, professor,
head of the sub-department of histology,
cytology and embryology, Saint Luka
Lugansk State Medical University
(1g 50-letiya Oborony Luganska
square, Lugansk, Russia)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests.

Поступила в редакцию / Received 28.09.2022

Поступила после рецензирования и доработки / Revised 25.10.2022

Принята к публикации / Accepted 12.11.2022