

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ МАТКИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ ДЕФИЦИТА МАГНИЯ В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Толокольников В.А.¹, Смирнов А.В.^{1,3}, Спасов А.А.¹, Бугаёва Л.И.^{1,2}, Лебедева С.А.^{1,2}, Быхалов Л.С.¹

¹ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России», (400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1), ppeva73@yandex.ru

²НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, (400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1)

³ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», (400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1)

Исследование проводилось на 70 белых крысах массой 180–200 г. Моделирование алиментарного дефицита магния проводили с использованием специальной магнийдефицитной диеты с дальнейшей фармакологической коррекцией препаратами магния в трех группах животных. Скорость и глубину развития гипомagneзиемии контролировали, определяя содержание магния в плазме и эритроцитах животных спектрофотометрическим методом. Патогистологическое исследование проводилось с использованием стандартных методов; изготовлены парафиновые срезы, окрашенные гематоксилинэозином, с последующей морфометрией. В эксперименте установлено, что при алиментарном дефиците магния наблюдались структурные изменения во всех слоях матки крыс, которые сопровождались значимыми отклонениями количественных морфологических показателей, свидетельствующими о разнонаправленной динамике изменений с преобладанием нарушений кровообращения и развитием процессов атрофического характера. При проведении фармакологической коррекции алиментарного дефицита магния сульфатом магния, аспарагинатом магния и таурином магния отмечалась различная по выраженности положительная динамика выявленных в матке компенсаторно-приспособительных изменений.

Ключевые слова: алиментарный дефицит магния, репродуктивная система, матка

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE PATHOLOGICAL CHANGES OF THE UTERUS OF RATS DURING THE DEVELOPMENT OF MAGNESIUM DEFICIENCY IN CONDITIONS OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION

Tolokolnikov V.A.¹, Smirnov A.V.^{1,3}, Spasov A.A.¹, Bugaeva L.I.^{1,2}, Lebedeva S.A.^{1,2}, Bykhalov L.S.¹

¹Volgograd state medical University, Volgograd, ppeva73@yandex.ru

²Research Institute of Pharmacology, Volgograd state medical University

³Volgograd medical research center, Volgograd

The study was conducted on 70 white rats weighing 180–200g. Modelling nutritional deficiency of magnesium was carried out using a special magnificent diet, with further pharmacological correction preparations of magnesium in three groups of animals. The speed and depth of development of hypomagnesaemia controlled by determining the content of magnesium in plasma and erythrocytes of animals, spectrophotometric method. Pathological examination was performed using standard methods, made paraffin sections, stained with hematoxylin – eosin, followed by morphometry. Results. The experiment found that when the nutritional magnesium deficiency were observed structural changes in all layers of the uterus of rats, which was accompanied by significant deviations of the quantitative morphological indicators demonstrating mixed dynamics with prevalence of circulatory disorders and the development of atrophic processes of nature. When conducting pharmacological correction of nutritional magnesium deficiency, magnesium sulfate, magnesium aspartate and taurinate magnesium were different according to the severity of positive dynamics identified in the uterus compensatory-adaptive changes.

Keywords: nutritional magnesium deficiency, reproductive system, uterus

В последнее время при изучении патологии беременности и родов внимание исследователей направлено на проблемы магнийдефицитных состояний [2]. В практической

деятельности для профилактики и лечения гипертонуса матки, нарушения функции фетоплацентарной системы и родовой деятельности могут использоваться различные магнийсодержащие препараты [3, 9]. Исследование структурных механизмов влияния дефицита магния на органы женской репродуктивной системы и поиск оптимальных препаратов, используемых для фармакологической коррекции патологических состояний, связанных с невынашиванием беременности и патологических состояний родов, являются актуальными проблемами акушерства и гинекологии [5]. Кроме того, данные о степени компенсаторных изменений в матке в условиях сформированного магнидефицитного состояния и его фармакологической коррекции различными препаратами магния остаются противоречивыми [6, 8]. Поиск закономерностей развития патоморфологических изменений является актуальной задачей и в настоящее время. Именно поэтому целью настоящего исследования является определение основных закономерностей морфологических изменений матки крыс при алиментарном дефиците магния и при его фармакологической коррекции в условиях экспериментального моделирования.

Материал и методы. Исследование проводилось на 70 белых беспородных крысах-самках массой 180–200 г в возрасте 6 месяцев. 1-ю группу [n=10] составили интактные самки. Проведение эксперимента, выбор, содержание животных, моделирование патологических процессов и выведение их из опыта соответствуют принципам биоэтики, правилам лабораторной практики (GLP), этическим нормам и проводились в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.) и Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики», МЗ ССР № 755 от 12.08.1977 г. Для определения фазы полового цикла на протяжении 10 последовательных дней у каждой самки брали влагалищный мазок, чтобы определить фазу и закономерности протекания остаточного овуляторного цикла у отобранных в эксперимент животных. В эстральном цикле фиксировали частоту встречаемости фаз (проэструса, эструса, метаэструса и диэструса). В эстральном цикле фиксировали частоту встречаемости фаз (проэструса, эструса, метаэструса и диэструса). Во 2-ю группу [n=10] вошли самки, находившиеся на магнидефицитной диете в течение 12 недель. Выведение животных из эксперимента проводили в фазу диэструса с использованием нембутала. Моделирование алиментарного дефицита магния проводили с использованием специальной магнидефицитной диеты, аналогичной диете, производимой фирмой MP Biomedicals (Aurora, Ohio, США), с 3,5%-м содержанием полиминеральной смеси, не содержащей магний. Весь рацион готовился на деионизированной воде, эту же воду в ходе эксперимента использовали в качестве питьевой

воды для животных, находящихся на диете. Скорость и глубину развития гипомagneзиемии контролировали, определяя содержание магния в плазме и эритроцитах животных, спектрофотометрическим методом по цветной реакции с титановым желтым. Для определения фазы полового цикла на протяжении 10 последовательных дней у каждой самки брали влагалищный мазок, чтобы определить фазу и закономерности протекания остаточного овуляторного цикла у отобранных в эксперимент животных. В эстральном цикле фиксировали частоту встречаемости фаз (проэструса, эструса, метаэструса и диэструса).

3-ю группу [n=10] составили самки, которые находились на магнидефицитной 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 сульфата (Magnesium sulphate) в течение 4 недель.

4-ю группу [n=10] составили самки, которые находились на магнидефицитной 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 таурината (Magnesium N-acetyltaurate) в течение 4 недель.

5-ю группу [n=10] составили самки, которые находились на магнидефицитной 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 аспарагината (Magnesium l-aspartate) в течение 4 недель.

Морфометрическое исследование проводилось с использованием программы «Видео-Тест-Морфо,4» с определением следующих показателей: толщина эндометрия и миометрия, высота однослойного столбчатого эпителия, объемная доля (ОД) ядер однослойного столбчатого эпителия, ОД маточных желез, высота экзокриноцитов маточных желез, ОД ядер экзокриноцитов маточных желез, ОД ядер гладких миоцитов, толщина сосудистой стенки. Статистическая обработка проведена общепринятыми для медико-биологических исследований методами ($p < 0,05$) непосредственно из общей матрицы данных EXCEL 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ STATGRAPH 5.1 (Microsoft, USA). Она включала определение показателей средней, среднеквадратичного отклонения и ошибки репрезентативности. Сравнение выборок осуществляли по критерию Стьюдента.

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ SPSS 21.0 for Windows. Рассчитывали средние величины и средние ошибки ($M \pm m$). Для непрерывных числовых показателей был проведен анализ распределения и критериев его соответствия нормальному.

При сравнении двух групп с нормальным характером распределения данных использовали t-тест для независимых группировок, а при характере распределения, отличном от нормального, применяли критерий χ^2 . Для определения достоверности различий в малых группах применяли критерий точной вероятности Фишера. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. При гистологическом исследовании матки экспериментальных животных, находившихся на безмагниевого диеты (группа 2), было установлено, что патоморфологические изменения проявлялись в виде неспецифических изменений, повреждения сосудов микроциркуляторного русла с последующим возникновением патологических изменений со стороны эндометрия и миометрия. Так, однослойный столбчатый эпителий характеризовался базальным расположением ядер овальной формы, неравномерным распределением хроматина. Цитоплазма клеток отличалась незначительной зернистостью за счет равномерного распределения белковых гранул. Выявлялись участки дистрофических изменений в виде набухания и массивной вакуолизации клеток со смещением ядер к центру и их более светлым прокрашиванием. Подлежащая эндометриальная строма была несколько уплотнена с незначительным количеством и неравномерным расположением маточных желез, выстланных экзокриноцитами призматической формы, с наличием вакуолей, расположенных в цитоплазме. Со стороны микроциркуляторного русла эндометрия наблюдалось частичное запустевание сосудов. Миометрий характеризовался наличием дистрофических изменений миоцитов с вакуолизацией цитоплазмы, отеком межмышечного пространства и полнокровием сосудов микроциркуляторного русла (эндотелиоциты с эозинофильной зернистостью). Ядра миоцитов были с четко определяемыми ядрышками. В строме по сравнению с контрольной группой отмечалось снижение числа эозинофилов в 10,7 раз ($p < 0,05$) с наличием единичных лимфоцитов. Периметрий был сохранен (рис. 1).

По результатам исследования массы матки крыс было установлено, что масса матки крыс в результате безмагниевого диеты уменьшилась на 66% ($p < 0,05$).

При морфометрическом сравнении алиментарного дефицита магния с группой контроля выяснилось, что снизилась толщина миометрия на 55,44% ($p < 0,05$) и эндометрия на 34,52% ($p < 0,05$), а толщина стенки сосудов оставалась практически неизменной. Наблюдались значительные изменения в таких показателях, как объемная доля желез эндометрия, которая снижалась на 40% ($p < 0,05$), высота однослойного столбчатого эпителия достоверно снижалась — 36,17% ($p < 0,05$), при этом отмечалось увеличение объемной доли ядер однослойного столбчатого эпителия на 30,20% ($p < 0,05$).

При исследовании сосудов миометрия было установлено, что при развитии алиментарного дефицита магния отмечался выраженный периваскулярный отек с участками дезорганизации соединительной ткани и выраженным отеком сосудистой стенки. Мышечная стенка сосудов характеризовалась неравномерным прокрашиванием и фокусами перинуклеарного просветления цитоплазмы миоцитов. Волокна соединительной ткани стенки сосудов были расположены рыхло, что свидетельствовало о дезорганизации и отеке.

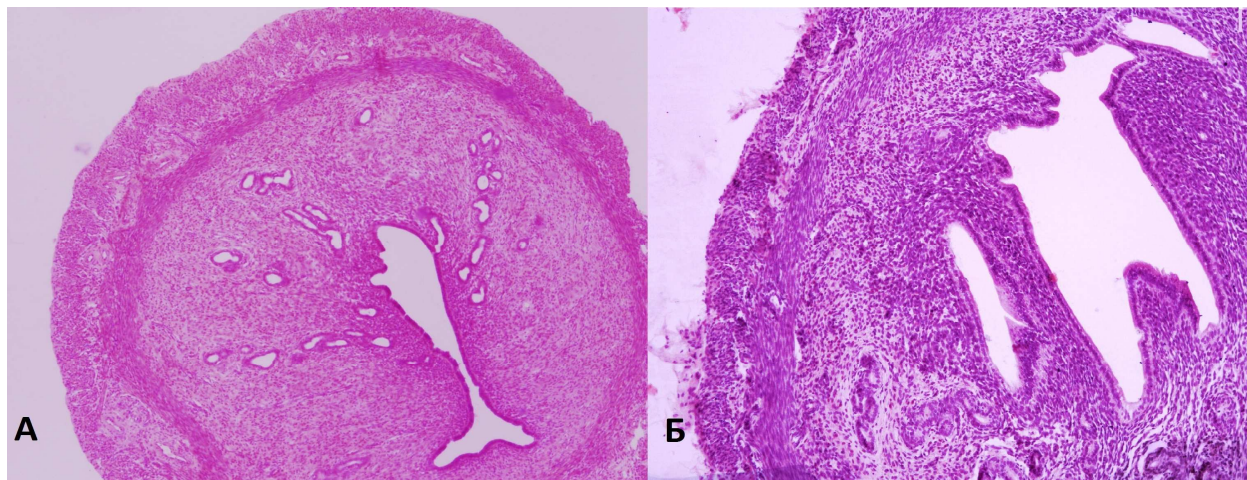


Рис. 1. Изменение структуры миометрия и эндометрия при алиментарном дефиците магния (Б), группа контроля (А)

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х40

При определении длительности эстрального цикла у контрольных животных по сравнению с животными, получавшими магнидефицитную диету, наблюдались достоверные отличия. Так, продолжительность фазы диэструса на 2-й неделе увеличилась на 94,12 % ($p < 0,05$), проэструса — на 100% ($p < 0,05$), а фазы эструса снизилась на 46,94 % ($p < 0,05$), в отличие от группы контроля. На 2-м месяце исследования достоверно уменьшилась продолжительность фазы эструса у магнидефицитных животных на 43,33 % ($p < 0,01$). Начиная со второго месяца магнидефицитной диеты уровень магния в плазме крови и эритроцитах достоверно уменьшился (табл. 1).

При проведении коррекции алиментарного дефицита магния отмечалось восстановление исходных значений уровня магния в плазме крови и эритроцитах, происходило незначительное увеличение продолжительности фазы эструса и уменьшение длительности фазы проэструса на фоне введения магниесодержащих препаратов.

Таблица 1

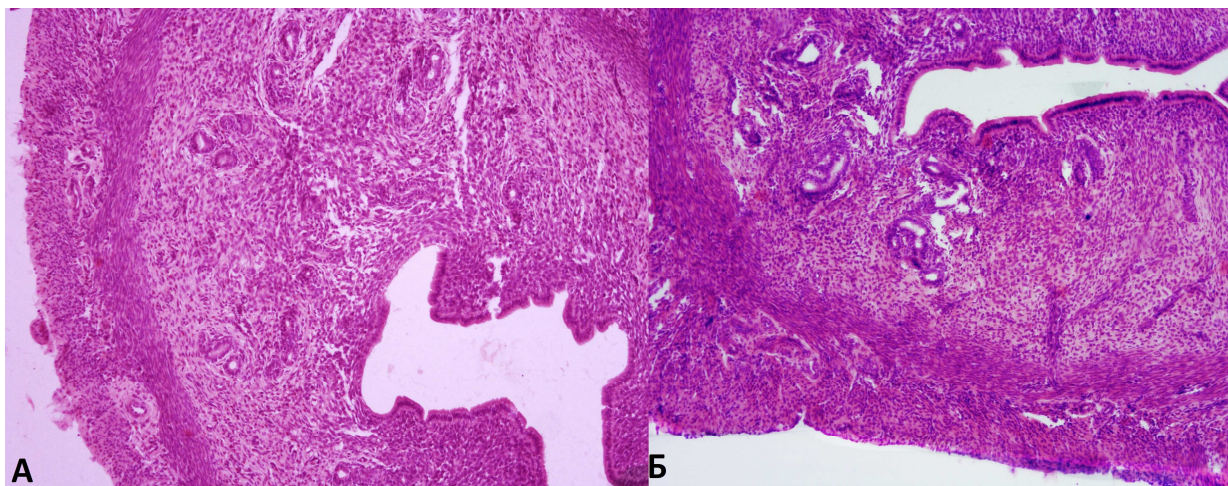
Влияние диеты без солей магния на эстральный цикл крыс ($M \pm m$)

Стадии эстрального цикла (дни) и уровень магния	контроль (интактный)	контроль – 1 (диета без солей магния)
---	----------------------	---------------------------------------

2 недели		
Диэструс	1,70±0,34	3,30±0,44*
Прозэструс	1,40±0,56	2,80±0,37*
Эструс	4,90±0,75	2,60±0,66*
Метаэструс	2,00±0,61	1,30±0,58
Уровень магния в плазме (ммоль/л)	1,21±0,07	1,10±0,04
Уровень магния в эритроцитах (ммоль/л)	2,08±0,07	1,94±0,04
1 месяц		
Диэструс	3,60±0,80	4,20±0,60
Прозэструс	2,20±0,34	1,80±0,41
Эструс	3,90±0,97	3,00±0,81
Метаэструс	0,30±0,20	1,00±0,16*
Уровень магния в плазме (ммоль/л)	1,40±0,16	1,03±0,03
Уровень магния в эритроцитах (ммоль/л)	2,08±0,07	1,89±0,03
1,5 месяца		
Диэструс	2,30±0,41	2,50±0,84
Прозэструс	2,90±0,76	3,50±0,47
Эструс	3,50±0,65	3,00±0,69
Метаэструс	1,30±0,20	1,40±0,53
3 месяца		
Диэструс	1,90±0,50	3,17±0,31*
Прозэструс	2,80±0,50	2,11±0,07
Эструс	4,00±0,43	2,78±0,36*
Метаэструс	1,30±0,37	1,94±0,40
Уровень магния в плазме (ммоль/л)	1,22±0,05	0,74±0,01**
Уровень магния в эритроцитах (ммоль/л)	2,07±0,05	1,33±0,06**

—* результаты достоверны относительно контроля при $p < 0,05$

—** результаты достоверны относительно контроля при $p < 0,01$



*Рис. 2. Увеличение толщины эндометрия, миометрия и объёмной доли желёз при коррекции таурином магния, группа 4 (А), алиментарный дефицит магния, группа 2 (Б)
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х40*

При коррекции аспарагинатом магния (животные 5-й группы) толщина эндометрия достоверно увеличилась более чем в 3 раза ($p < 0,05$) относительно группы дефицита магния и превышала значения группы контроля на 34,52 % ($p < 0,05$). При коррекции алиментарного дефицита магния такими препаратами, как сульфат магния и тауринат магния, толщина эндометрия незначительно снижалась (на 9,09% ($p > 0,05$) и на 5,64% ($p > 0,05$) соответственно относительно группы контроля), но отмечалось увеличение толщины эндометрия относительно группы алиментарного дефицита магния на 104,02% ($p < 0,05$), а при коррекции таурином магния — на 137,07% ($p < 0,05$).

При исследовании миометрия у животных 3-й группы (коррекция сульфатом магния) наблюдалось увеличение его толщины на 25,73% ($p < 0,05$), у животных 4-й группы (коррекция таурином магния) толщина миометрия увеличивалась на 5,64% ($p > 0,05$), а у крыс 5-й группы (коррекция аспарагинатом магния) увеличивалась на 21,47% ($p > 0,05$) относительно интактной группы.

При морфометрическом исследовании в 4-й группе (коррекция таурином магния) высота экзокриноцитов желёз нормализовалась, а объёмная доля ядер экзокриноцитов желёз достоверно увеличилась на 29,76 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля (рис. 2). При исследовании животных 5-й группы (коррекция аспарагинатом магния) высота экзокриноцитов желёз достоверно снизилась на 17,81% ($p < 0,05$), а объёмная доля (ОД) ядер экзокриноцитов ядер желёз увеличилась на 33,48% ($p < 0,05$). При коррекции сульфатом магния высота экзокриноцитов желёз достоверно снижалась на 42,48% ($p < 0,05$), объёмная доля (ОД) ядер экзокриноцитов ядер желёз увеличивалась на 31,02% ($p < 0,05$) относительно показателей интактных животных.

Таблица 2

Морфометрические показатели матки крыс при алиментарном дефиците магния и при его фармакологической коррекции

Морфометрические показатели	Контроль (Интактные)	Дефицит магния	Сульфат магния	Тауринат магния	Аспарагинат магния
Толщина эндометрия, мкм	915,81±22,90	408,11±9,76*	832,61±22,14 [#]	967,50±24,42 [#]	1231,93±38,23 ^{*#}
Толщина миометрия, мкм	561,75±7,93	169,96±4,27*	706,28±11,02 ^{*#}	501,84±13,63 [#]	682,36±21,87 [#]
Соотношение эндометрий/миометрий	2,34±0,11	2,43±0,04	0,88±0,10 ^{*#}	2,19±0,12	2,33±0,11
Толщина стенки сосудов миометрия, мкм	36,03±0,58	33,78±0,96	38,34±0,47	38,09±0,47	47,61±0,66*
ОД желез эндометрия, %	4,60±1,8	2,30±0,1*	4,1±0,3*	2,3±0,6*	1,3±0,2 ^{*#}
Высота однослойного столбчатого эпителия, мкм	35,35±1,11	22,57±0,58*	30,41±0,43	54,43±0,57 ^{*#}	41,18±0,54 [#]
ОД ядер однослойного столбчатого эпителия, %	30,11±4,7	39,20±2,83*	46,21±2,84 ^{*#}	43,44±1,38 ^{*#}	43,04±1,93*
Высота экзокриноцитов желёз, мкм	36,49±0,48	16,56±0,17*	20,99±0,26 ^{*#}	36,52±0,33 [#]	29,99±0,33 ^{*#}
ОД ядер экзокриноцитов желёз, %	37,45±1,67	39,42±2,75	49,07±1,65 ^{*#}	48,59±1,75 ^{*#}	49,99±1,56 ^{*#}

* — результаты достоверны относительно группы контроля при $p < 0,05$;

— результаты достоверны относительно группы алиментарного дефицита магния при $p < 0,05$.

Обсуждение. Обнаруженные нами структурные изменения в стенке матки крыс при алиментарном дефиците магния и нарушение эстрального цикла свидетельствуют об угнетении репродуктивной функции вследствие развившегося электролитного дисбаланса, возникновения патоморфологических изменений в сосудах микроциркуляторного русла, что подтверждается снижением концентрации магния в плазме крови экспериментальных животных и согласуется с имеющимися экспериментальными данными и, возможно, связано с нарушением гипоталамо-гипофизарной регуляции [1].

При коррекции магнидефицитного состояния сульфатом, аспарагинатом и тауринатом магния нами обнаружены менее выраженные структурные изменения матки, что свидетельствует о запуске компенсаторных механизмов и относительном восстановлении репродуктивной функции, вызванном алиментарным дефицитом магния, о чем

свидетельствуют качественные сдвиги: уменьшение явлений отека, дезорганизации соединительной ткани всех слоев матки и ее сосудистой системы, подтверждающиеся результатами морфометрического исследования и литературными данными [4, 7], что, по-видимому, связано с ангиопротекторными и противовоспалительными эффектами различных солей магния.

Таким образом, установлено, что при моделировании магнийдефицитного состояния наблюдаются структурные изменения во всех слоях матки крыс, сопровождающиеся значимыми отклонениями количественных морфологических показателей, свидетельствующими о разнонаправленной динамике изменений с преобладанием нарушений кровообращения и развитием процессов атрофического характера.

Выводы. При моделировании алиментарного дефицита магния выявлены структурные изменения в виде уменьшения толщины эндометрия, миометрия, снижения объемной доли желёз эндометрия и высоты экзокриноцитов желёз эндометрия, что свидетельствует о возникновении атрофических процессов в слизистой и мышечной оболочках органа. Морфологические данные подтверждаются нарушениями эстрального цикла в виде удлинения фазы диэструса и укорочения фазы эструса, что может быть связано с нарушением магниезависимых метаболических процессов и гипоталамо-гипофизарно-овариальной регуляции.

При фармакологической коррекции алиментарного дефицита магния аспарагинатом магния отмечается нормализация толщины миометрия, что сопровождается восстановлением длительности фаз эстрального цикла. При этом компенсаторные изменения и восстановление значений большинства морфометрических параметров более выражены по сравнению с применением таурината или сульфата магния.

Применение в качестве фармакологической коррекции алиментарного дефицита магния таурината или сульфата магния приводит к неполному восстановлению структурных компонентов эндометрия и миометрия, сопровождается увеличением объемной доли маточных желёз до контрольных значений при использовании сульфата магния, что свидетельствует о существовании различий в лекарственном патоморфозе магнийдефицитного состояния и может объяснить различия в характере и динамике изменений репродуктивной функции крыс.

Список литературы

1. Котельников А.В., Котельникова С.В. Характеристика эстрального цикла белых крыс на разных этапах онтогенеза при введении витамина Е // Вестник Астраханского

государственного технического университета. – 2005 – № 3. – С. 215–218.

2. Кошелева Н.Г. Применение препаратов магния в акушерстве и гинекологии // Акушерство и гинекология. — 2004. — № 2. — С. 62–64.

3. Спасов А.А., Иежица И.Н., Харитонов М.В., Кравченко М.С., Снигур Г.Л. Роль алиментарного дефицита магния в формировании нефролитиаза у крыс и его коррекция солями магния. Вопросы питания. — 2008. — Т. 77, № 6. — С. 62–71.

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

5. Gales C, Zamfir C, Radulescu D, Stoica B, Nechifor M. Protective effect of magnesium and metformin on endometrium and ovary in experimental diabetes mellitus // Magnes Res. – 2014 – Vol. 2, № 27. P. 69–76.

6. Cunze T, Spätling L, Kunz P.A., Fallenstein F., Kuhn W., Huch A. Plasma and myometrium electrolyte changes in the last trimester of pregnancy. Geburtshilfe Frauenheilkd. – 1994 – Vol. 6, № 54. – P. 362–366.

7. Kharitonova M., Iezhitsa I., Zheltova A., Ozerov A., Spasov A., Skalny A. J // Comparative angioprotective effects of magnesium compounds. Trace Elem Med Biol. – 2015 – № 29. P. 227–234. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.06.026. Epub 2014 Jul 8.

8. Skajaa K., Dørup I., Sandström B.M. Magnesium intake and status and pregnancy outcome in a Danish population. // Br J Obstet Gynaecol. – 1991 – Vol. 9, № 98. P. 919–928.

9. Yildirim E., Macun H.C., Cinar M., Yiğit A.A., Ustüner I., Aydos T.R., Aktuna Z. The effects of magnesium sulphate on the contractile activity of uterus in an animal model of preeclampsia. Clin Exp Obstet Gynecol. – 2014 – Vol. 2, № 41. P. 169–173.

Рецензенты:

Ермилов В.В., д.м.н., профессор кафедры судебной медицины Волгоградского Государственного медицинского университета, г. Волгоград;

Снигур Г.Л., д.м.н., доцент, заведующий кафедрой биологии Волгоградского Государственного медицинского университета, г. Волгоград.