

На правах рукописи

**Гусейнова
Фаина Махмудовна**

**НАРУШЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЖЕНЩИН,
ПЕРЕНЕСШИХ ТУБЕРКУЛЕЗ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.01.16 - фтизиатрия

14.01.01 - акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации и федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Виноградова Татьяна Ивановна
доктор медицинских наук Гзгзян Александр Мкртичевич

Официальные оппоненты:

Мордык Анна Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет», кафедра фтизиатрии, фтизиохирургии и инфекционных болезней, заведующая

Кузьмин Владимир Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра репродуктивной медицины и хирургии факультета дополнительного профессионального образования, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» декабря 2019 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.092.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4, тел. (812) 775-75-55).

С диссертацией можно ознакомиться на официальном сайте www.spbniif.ru ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России и в научной библиотеке (191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. (812) 775-75-55)

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Виноградова Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационного исследования

Бесплодие и репродуктивные потери являются одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем. Частота сочетанного бесплодия в России составляет в среднем 8%, в отдельных регионах - 17,5% и не имеет тенденции к снижению (Караушев А.Ю., 2015; Овсянникова Т.В., 2016; Абрамова В.Н., 2017; Лысенко О.В., 2017).

Особое место в развитии бесплодия занимают воспалительные процессы, в том числе туберкулез женских половых органов (Бочарова Ю.С., 2014; Самойлова А.В., 2015; Sharma J.V., 2008). Несмотря на современные методы диагностики и лечения, снижение показателя смертности, туберкулез остается одной из главных мировых проблем. Количество заболевших туберкулезом в мире в 2016 г, по данным ВОЗ, оценивалось в 10,4 миллиона человек, из которых 6,3 миллиона - впервые выявленные случаи. Частота туберкулеза внелегочной локализации продолжает неуклонно увеличиваться (Berg S., 2015; Sama J.N., 2016), на долю туберкулеза мочеполовых органов приходится около 27% всех внелегочных локализаций (Shirazi M., 2015; Sinha R. J., 2017; Zachova I.R., 2017; Jacek J., 2018). Туберкулезное воспаление гениталий в большинстве случаев развивается в репродуктивном возрасте (Eftekhar M., 2015), долгое время не проявляется клинически или имеет неспецифическую симптоматику. Туберкулезный сальпингит приводит к необратимым повреждениям маточных труб (Malhotra N., 2012; Mondal S.K., 2013; Sharma J. V., 2015). Исход в трубно-перитонеальное бесплодие даже на фоне специфической полихимиотерапии наблюдается в 90-97% случаев туберкулезного поражения половых органов, в 10-15% случаев туберкулезный процесс распространяется на полость матки, вызывая развитие спаечной болезни полости матки – синдром Ашермана (Dwivedi K., 2015; Perdhana R., 2016). Процент восстановления фертильности при рубцово-спаечном процессе маточных труб и эндометрия, по некоторым данным, составляет лишь 7,2% (Djuwantono T., 2017; Aslan G., 2018). В связи с этим наряду со специфической полихимиотерапией при генитальном туберкулезе используются вспомогательные методы лечения (физиотерапия, иммунотерапия), но без достаточного эффекта (Гришин М.Н., 2015; Ширинкина А.Е., 2015). В настоящее время с целью восстановления структуры и функции поврежденных тканей во многих областях медицины активно используется клеточная терапия (Сухих Г.Т., 2016; Ярыгин К.Н., 2016; Nicolay NH, 2015; Petrella F., 2015; Trohatou O., 2017). Появились сообщения о применении клеточного продукта на основе стволовых клеток при туберкулезе легких (Skrahin A., 2014; Parida S.K., 2015). В этой связи особую актуальность представляет экспериментальная разработка подходов к использованию мезенхимальных стромальных клеток в гинекологической практике (Сухих Г.Т., 2018; Zhang L., 2018; Но СН, 2018; Ling L., 2019; Zhu Z., 2019), в том числе, в комплексной терапии туберкулеза половых органов.

В течение многих лет в экспериментальных исследованиях, посвященных туберкулезной инфекции (Ahmad F., 2017; Kroesen V.M., 2018; Rawat K.D., 2018), решается задача, ориентированная на формирование определенных форм туберкулезного процесса у животных (Ramos Robles B., 2018). Различные способы моделирования туберкулеза половых органов (Борима Т.В., 1971; Блохин Н.Н., 1973; Купарадзе Ш.М., 1981, 1982), многие из которых реализовались на фоне генерализованного процесса, были проанализированы в диссертационной работе Ю.И. Рекеля (1985), который в дальнейшем предложил оригинальную модель

туберкулеза маточных труб и маточных рогов у кролика. Однако в условиях этой модели ограничена принципиальная возможность анализировать показатели развития специфического воспалительного процесса в динамике и в различных индуцируемых условиях. Эти данные диктуют необходимость разработать новую ограниченную половыми органами модель туберкулезной инфекции, позволяющую оценить в экспериментальных условиях терапевтическую эффективность мезенхимальных стромальных клеток с возможностью их дальнейшей клинической апробации и внедрения в практику.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время туберкулез женских половых органов и его осложнения остаются весьма актуальными, ввиду их высокой медицинской и социально-экономической значимости. Особенности эпидемиологии, развития туберкулезного процесса в половых органах и его клинических проявлений изучаются многими авторами (Sharma JB., 2015; Abdelrub AS, 2015; Shirazi M, 2015). Особое внимание уделяется использованию различных методов диагностики для выявления заболевания на ранней стадии (Ahmadi F., 2014; Bhanothu V., 2014; Farrokh D., 2015; Lee JY, 2015). Однако количество работ, в которых проводилась бы комплексная оценка репродуктивной функции у женщин, перенесших генитальный туберкулез, невелико. В анализируемой литературе отсутствуют сведения об использовании новых методов патогенетической терапии, улучшающих репарацию и восстановление фертильности при генитальном туберкулезе. Все вышеизложенное послужило основанием для настоящего исследования и определило его актуальность и цель.

Цель исследования: снижение рисков нарушения фертильности у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, и разработка способа восстановительной терапии при рубцово-спаечном процессе маточных труб с использованием мезенхимальных стромальных клеток костного мозга.

Задачи исследования:

1. Оценить информативность клиничко-анамнестических, клиничко-лабораторных показателей и результатов инструментальных методов обследования, характеризующих последствия туберкулезной инфекции половых органов у женщин.
2. Изучить параметры, определяющие овариальный резерв у женщин, эффективно завершивших курс специфической полихимиотерапии по поводу туберкулеза половых органов.
3. Разработать математическую модель вероятности развития туберкулезной инфекции половых органов у женщин из группы риска на основе параметров, характеризующих состояние органов репродуктивной системы у женщин, перенесших генитальный туберкулез.
4. Изучить влияние мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) в сочетании с противотуберкулезными препаратами на течение экспериментальной туберкулезной инфекции половых органов и на структурно-функциональную характеристику маточных труб у модельных животных.

Научная новизна

Впервые:

- на основе системного анализа определена структура и особенности нарушения репродуктивной функции у женщин, эффективно завершивших курс специфической полихимиотерапии по поводу туберкулеза половых органов, а именно: определены эндокринные, морфофункциональные, иммуногистохимические изменения, приводящие к нарушению репродуктивной функции;

- проведена интегральная оценка показателей овариального резерва у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов;
- выделены морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические показатели, характеризующие состояние эндометрия у женщин, перенесших туберкулез половых органов и получивших специфическую полихимиотерапию;
- представлена характеристика видового состава ассоциации микроорганизмов в полости матки и цервикагинальном отделяемом у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов;
- разработаны методические подходы к моделированию туберкулезной инфекции женских половых органов в эксперименте на кроликах (патент на изобретение №2600926);
- в условиях разработанной модели изолированной туберкулезной инфекции женских половых органов у кроликов определена терапевтическая эффективность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, обеспечивающая в сочетании с комплексной специфической полихимиотерапией возможность репаративного ремоделирования поврежденных тканей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены структурно-функциональные особенности, формирующие нарушение репродуктивной функции у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, а именно, нормогонадотропная недостаточность яичников, спаечная болезнь органов малого таза и необратимый рубцово-спаечный процесс маточных труб, приводящий к их окклюзии, снижение овариального резерва, риск нарушения имплантационной способности эндометрия (хронический эндометрит, спаечная болезнь полости матки, нарушение рецептивности эндометрия).

Создана математическая модель, позволяющая с высокой достоверностью прогнозировать развитие туберкулезной инфекции половых органов у женщин на основе совокупности показателей нарушения менструального цикла, результатов гистеросальпингографии и пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным. Частота истинно-отрицательного прогностического результата представленной модели (90,5%), частота истинно-положительного результата (63,5%) и общая точность прогноза (81,5%) предложенного метода определяют целесообразность его использования, имея в виду показания для углубленного обследования женщин из группы риска.

Предложен комплекс обследований женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, характеризующий состояние и резервные возможности репродуктивной системы.

Определены анатомические, гормональные и молекулярно-биологические особенности нарушения репродуктивной функции у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, которые позволяют в дальнейшем оптимизировать сроки и подходы к планированию беременности, персонализированной прегравидарной подготовке к спонтанной беременности и в циклах ВРТ, выбору методов преодоления бесплодия.

Созданный способ моделирования туберкулеза половых органов позволяет осуществлять прижизненный мониторинг и оценивать тяжесть течения специфического воспалительного процесса от момента заражения до эвтанази у конкретного животного, включенного в исследование, а также разрабатывать тактику восстановительного лечения на разных этапах развития заболевания.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение общенаучных методов познания (сравнение и аналогия, абстрагирование). Методы исследования выбирались, исходя из постановки решаемых задач, с учетом особенностей исследуемых объектов (женщины, не имеющие туберкулезную инфекцию в анамнезе, а также на момент исследования и женщины с туберкулезным поражением гениталий после специфической полихимиотерапии). В работе использована совокупность методов: клинико-анамнестический, клинико-лабораторный, микробиологический, молекулярно-генетический (ПЦР); оценка гормональной функции яичников; иммунологический, инструментальные и лучевые методы (магнитно-резонансная томография, УЗИ органов малого таза, гистеросальпингография), эндоскопические (лапароскопия, гистероскопия); гистологические и иммуногистохимические исследования биоптатов эндометрия, статистические методы анализа результатов. Оценка эффективности клеточного продукта на основе мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в составе комплексной терапии туберкулезной инфекции выполнена на разработанной модели туберкулеза женских половых органов (патент на изобретение №2600926) с использованием биометрических, биохимических, гематологических, иммунологических и гистологических методов исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Последствиями перенесенного туберкулеза женских половых органов являются нормогонадотропная недостаточность яичников, хронический эндометрит с высокой цитотоксической активностью натуральных киллерных клеток, спаечная болезнь органов малого таза и полости матки. Эндоскопические методы исследования с интраоперационной оценкой проходимости маточных труб обладают высокой информативностью и являются адекватными для интегральной оценки состояния органов репродуктивной системы у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов.
2. Овариальный резерв у женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, характеризуется достоверным снижением уровня антимюллеровского гормона в периферической крови ($p < 0,05$).
3. Применение математической модели комплексной оценки клинического, лучевого и иммунологического обследования, основанной на логистическом регрессионном анализе, позволяет с высоким уровнем значимости провести прогностическую оценку риска развития туберкулезной инфекции половых органов у женщин из группы риска.
4. У экспериментальных животных возможно создание изолированной модели туберкулеза женских половых органов, позволяющей изучать процесс развития специфической инфекции гениталий и разрабатывать новые технологии лечения. Применение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в комплексе с противотуберкулезными препаратами сдерживает раннее фиброзирование и деформацию ампулярного отдела маточных труб.

Степень достоверности и апробация результатов работы

В ходе выполнения диссертационного исследования применен комплекс современных методов сбора и обработки первичной информации, формирования пула репрезентативных выборок с созданием массива данных. Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечены применением адекватных статистических методов анализа полученных результатов.

Результаты исследования внедрены в практику работы отделения туберкулезного для больных урогенитальным туберкулезом № 9 и в научно-исследовательский процесс по направлению "Экспериментальный туберкулез и инновационные технологии" ФГБУ "СПб НИИФ" Минздрава России, в лечебно-диагностический процесс ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» и СПб ГБУЗ "Городской противотуберкулезный диспансер», а также в практику преподавания на кафедре акушерства, гинекологии и репродуктологии медицинского факультета СПбГУ.

По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, из них 4 – в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, получен патент на изобретение RUS "Способ моделирования туберкулеза женских половых органов" (№ 2600926/27.10.2016).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на научно-практических мероприятиях различного уровня, в том числе на XVIII и XIX Международных медико-биологических конференциях молодых исследователей (Санкт-Петербург, 2015; 2016); на XI Международной конференции "Актуальные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии" (Судак, 2015); на IV, V, VI, VII конгрессах Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (Санкт-Петербург, 2015, 2016, 2017, 2018); на VI Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий» (Санкт-Петербург, 2018); на 18 Международном Конгрессе по гинекологической эндокринологии (Флоренция, Италия, 2018); на конференции молодых репродуктологов «Искусство ART» (Санкт-Петербург, 2018); на заседании Ученого совета ФГБУ "СПб НИИФ" Минздрава России (Санкт-Петербург, 04.06.2019).

Личный вклад автора в исследование. Участие автора выразилось в определении идеи работы, основанной на анализе отечественной и зарубежной литературы, и разработке дизайна исследования. Автор непосредственно принимала участие в обследовании, ведении и лечении пациентов с туберкулезом женских половых органов, вошедших в материал диссертационного исследования, выполнении экспериментальных исследований. Лично автором проведен анализ и обобщение клинического и экспериментального материала.

Структура и объем диссертации. Представленная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 229 страницах, содержит 48 таблиц, иллюстрирована 42 рисунками. Список литературы включает 120 отечественных и 292 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, задачи исследования, научная новизна, практическое и теоретическое значение работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования. Рассмотрены современные представления о туберкулезе женских половых органов, патогенез, диагностика, тактика ведения больных, особенности репродуктивной функции женщин, перенесших туберкулезную инфекцию половых органов, возможности экспериментального моделирования туберкулезной инфекции женских половых органов; проанализирована роль мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в улучшении репаративных процессов в органах и тканях, обоснование применения в клинической медицине.

Во второй главе диссертации описаны материалы и методы исследования.

В клинической части использованы данные, полученные в результате обследования 260 женщин в отделении туберкулезном для больных урогенитальным туберкулезом № 9 ФГБУ "СПб НИИФ" Минздрава России с 2004 по 2016 гг. Основная группа: 131 женщина (средний возраст $31,3 \pm 5,9$ лет), эффективно пролеченная по поводу туберкулеза половых органов. Группа сравнения: 129 женщин (средний возраст $30,7 \pm 5,0$ лет) с подозрением на туберкулез половых органов, исключенный по результатам комплексного обследования. Критерии включения в основную группу: возраст 18-45 лет, установленный туберкулез половых органов, полный курс полихимиотерапии, законченный не ранее, чем за 3 месяца до настоящего исследования. Критерии исключения из основной группы: активный туберкулез любой локализации, тяжелая соматическая патология, наркозависимость и алкоголизм, ВИЧ-инфекция, острые воспалительные заболевания любой локализации, наличие онкологических заболеваний. Критерии включения в группу сравнения: возраст 18-45 лет, факторы риска туберкулеза, исключенный активный туберкулез любой локализации и туберкулез половых органов, нарушение менструальной функции, нарушение репродуктивной функции, частые обострения воспалительных заболеваний органов малого таза, не поддающиеся стандартной антибактериальной терапии, хронические тазовые боли продолжительностью не менее 6 мес. Критерии исключения из группы сравнения: тяжелая соматическая патология, наркозависимость и алкоголизм, ВИЧ – инфекция, острые воспалительные заболевания любой локализации, наличие онкологических заболеваний.

Диагностический алгоритм включал: клинико-anamnestический метод, комплексное лабораторное обследование, инструментальные методы исследования (УЗИ и МРТ органов малого таза, ГСГ, рентгенографию и МСКТ органов грудной клетки), иммунологические методы обследования (проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным), микробиологическое обследование (люминесцентная бактериоскопия, посев диагностического материала на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена, посев на жидкую питательную среду с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT 960, ПЦР), гистологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия, эндоскопические методы (лапароскопия и гистероскопия), гормональное исследование; статистические методы анализа полученных результатов. Спаечный процесс органов малого таза оценивали согласно классификации AFS (1988), в полости матки - использовали классификацию Европейской ассоциации гинекологов эндоскопистов (1993). Степень тяжести генитального эндометриоза - по

пересмотренной классификации Американского общества фертильности (R-AFS, 1996). Расположение миоматозных узлов – согласно классификации FIGO (2011).

Оценка степени влияния отдельных факторов на вероятность туберкулеза половых органов, и разработка модели прогнозирования проводилась с использованием логистического регрессионного анализа. В логистический регрессионный анализ были включены переменные, имеющие достоверную ($p < 0,05$) корреляционную связь с фактом генитального туберкулеза и выделенные на основании значений коэффициента Спирмена. Для оценки точности прогнозирования был применен ROC-анализ и следующие показатели информативности: AUC (величина площади под кривой), частота истинно-отрицательного и истинно-положительного прогностического результата, чувствительность математической модели.

Экспериментальная часть исследования выполнена в двух сериях опытов на 39 кроликах-самках породы шиншилла массой 2,5-3,0 кг в условиях сертифицированного вивария ФГБУ "СПб НИИФ" Минздрава России. Все исследования проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными "Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. CETS No. 123, 1991). Критерии включения животных в эксперимент: положительная динамика массы тела в период карантина, отсутствие видимых симптомов заболевания. Первая серия опытов - разработка модели изолированного туберкулеза женских половых органов в 2-х группах наблюдения: 1) интактные кролики – здоровые, незараженные ($n=6$), 2) подопытные животные, инфицированные микобактериями туберкулеза ($n=6$). Во второй серии (на 27 кроликах) разработанная модель использована для оценки эффективности мезенхимальных стромальных клеток в составе комплексной специфической химиотерапии: 1 группа ($n=6$) – интактные животные; 2 группа ($n=7$) – кролики, зараженные, нелеченные (контроль заражения); 3 группа ($n=7$) – кролики, леченные только противотуберкулезными препаратами (ПТП); 4 группа ($n=7$) – животные, получавшие ПТП в комплексе с МСК. Для моделирования генитального туберкулеза использовали суспензию стандартизированного лекарственно чувствительного вирулентного штамма *M. tuberculosis* Erdman (МБТ) второй генерации (из коллекции ФГБУ «Научный Центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России), которую инокулировали под серозную оболочку левой маточной трубы в дозе 10^7 КОЕ/0,2 мл. Противотуберкулезную терапию начинали при положительных результатах кожной пробы с АТР через 1 месяц от момента заражения с использованием изониазида (внутримышечно, 10 мг/кг), рифампицина (внутрижелудочно, 10 мг/кг), этамбутола (внутрижелудочно, 20 мг/кг) и перхлорона (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат, внутрижелудочно, 15 мг/кг). Аллогенные МСК, окрашенные прижизненно РКН-26 (1kit Lot 122k0428 РКН26 RED- Fluorescent -cell linker mini kit, Sigma-Aldrich, США), в концентрации 5 млн/мл трансплантировали однократно под серозную оболочку левого маточного рога через 2 месяца от начала химиотерапии кроликам 4 группы. Выделение и культивирование МСК проводили в Центре клеточных технологий Института цитологии РАН совместно со старшим научным сотрудником, к.б.н. Н.М. Юдинцевой по стандартной методике (Gudleviciene et al., 2015), иммунофенотипирование клеток третьего пассажа - с помощью моноклональных антител Abcam (США) на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter). Относительное количество позитивных клеток по иммунофенотипическим маркерам CD90+ и CD105+, характерным для МСК, составило 81% и 92% (соответственно),

гемопозитический маркер CD45+ отсутствовал. Идентификацию окрашенных клеток проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм.

Контроль эффективности терапии осуществляли комплексно с использованием кожной пробы с АТР, гематологических и биохимических показателей периферической крови, лучевых методов (компьютерная томография, гистеросальпингография и лапароскопия). Эффективность фагоцитоза исследовали в культуре перитонеальных макрофагов (пМф) кроликов в отношении дрожжевых клеток рода *Saccharomyces cerevisiae*, предварительно опсонизированных сывороткой мышей, результаты выражали в показателе фагоцитарной активности (ФА) - процент пМф, вовлеченных в фагоцитоз; в фагоцитарном числе (ФЧ) - среднее количество дрожжевых клеток, поглощенных одним пМф; в показателе завершенности фагоцитоза (ПЗФ) - количество дрожжевых клеток, переваренных Мф за 1,5 часа культивирования; в индексе завершенности фагоцитоза (ИЗФ) - отношение ФЧ за 1 час культивирования к ФЧ за 2,5 часа культивирования. Микроскопическое и морфометрическое исследование проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином и по Цилю-Нельсену, на микроскопе Nikon Si-S с видеоцифровой обработкой изображений. Все манипуляции с экспериментальными животными выполняли под общим обезболиванием. Животных в обеих сериях экспериментов выводили путем эвтаназии.

Процедуры статистического анализа выполняли с помощью параметрического и непараметрического методов. Были использованы традиционные показатели описательной статистики: число наблюдений (n), среднее арифметическое (M), средняя ошибка средней арифметической (m). Статистическая значимость различий для параметрических величин определялась с использованием t-критерия Стьюдента, для непараметрических величин - с помощью U-критерия Манна-Уитни. Оценку связи номинальных переменных с нормальным распределением осуществляли с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r) с расчетом значимости его значений по t-критерию. Для оценки эффективности лечения применяли метод дисперсионного анализа для зависимых выборок (ANOVA Repeated).

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию результатов клинической части исследования. В структуре генитального туберкулеза среди женщин основной группы туберкулезный сальпингит установлен у 130 больных (99,2%), эндометрит - у 20 (15,3%). Туберкулез яичников и шейки матки не определялся. Генитальный туберкулез установлен на основании клинико-рентген-лабораторных данных - у 74 женщин (56,5 %), гистологического исследования операционного материала - у 18 (13,7%), бактериологических и бактериоскопических методов - у 39 женщин. Основными жалобами, выявляемыми у женщин в основной группе и группе сравнения, являлись, соответственно: нарушение репродуктивной функции (77,9% и 75,2%, $p > 0,05$), хронические тазовые боли продолжительностью от 6 месяцев и более (70,2% и 69,0%, $p > 0,05$), диспареуния (9,2% и 31,0%, $p < 0,01$) и альгоменорея (17,6% и 44,2%, $p < 0,05$), требующие прием НПВС от 1 до 3-х дней, повышение температуры тела до субфебрильных значений от 1 месяца до 10 лет и более при отсутствии явных причин (27,5% и 10,1%, $p < 0,001$), общеинтоксикационные симптомы (16,0% и 1,6%, $p < 0,001$),.

Отягощенный фтизиатрический анамнез выявлен у 44 (33,6%) женщин основной группы, в группе сравнения - у 13 (10%, $p < 0,001$). Установлено, что перенесенный абдоминальный туберкулез увеличивает вероятность туберкулеза

половых органов в 1,1 раз, мочевыделительной системы - в 1,1 раз, легких – в 1,1 раз, периферических лимфатических узлов – в 1,04 раз ($p \leq 0,05$).

Регулярный менструальный цикл наблюдался у 80 больных основной группы (61,1%) и у 70 (54,3%) женщин из группы сравнения ($p > 0,05$). Обследуемые группы были сравнимы по продолжительности цикла и длительности периода менструальных выделений ($p > 0,05$), нарушение менструального цикла по типу олигоменореи встречалось достоверно чаще в основной группе ($p < 0,001$), а гиперполименорея - среди женщин из группы сравнения ($p < 0,001$) (рисунок 1).

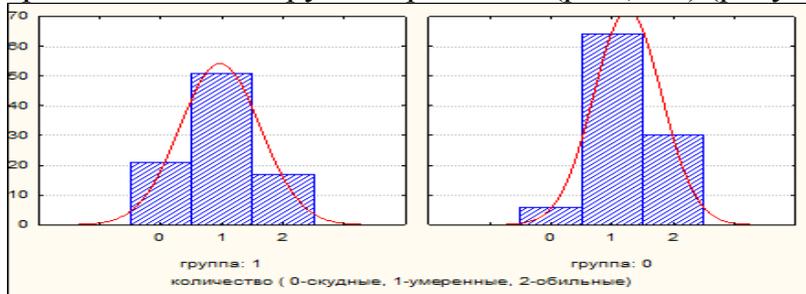


Рисунок 1 - Характер менструального кровотечения у женщин обследуемых групп.

Примечание: 0 – группа сравнения, группа 1- женщины, пролеченные по поводу туберкулеза половых органов.

Установлено, что 102 (77,9%) женщины основной группы и 97 (75,2%) в группе сравнения ($p > 0,05$) страдали бесплодием средней продолжительностью $6,2 \pm 0,6$ лет и $4,1 \pm 0,4$ года (соответственно, $p < 0,001$). В структуре бесплодия у женщин основной группы отмечено достоверное преобладание первичного бесплодия над вторичным (56,9% против 49,5%, соответственно, $p < 0,05$). Среди женщин обеих групп, страдающих первичным бесплодием, у больных, перенесших туберкулез половых органов, достоверно чаще встречалась двусторонняя окклюзия маточных труб (соответственно 46,6% против 4,1%, $p < 0,05$).

Гормональное обследование проведено 30 пациенткам с подтвержденным диагнозом и эффективно пролеченным по поводу туберкулеза половых органов и 31 женщине из группы сравнения. Все обследованные были сравнимы по возрасту и по характеру произведенных оперативных вмешательств на яичниках ($p > 0,05$). Уровни гонадотропных гормонов, гормонов щитовидной железы, тестостерона и пролактина в обеих группах находились в пределах референсных значений. Среди женщин основной группы в 76,7% случаев имела место нормогонадотропная нормопролактинемическая недостаточность яичников, среди них с ановуляторными циклами - 10 женщин (43,5%) и недостаточностью лютеиновой фазы. Достаточный двухфазный менструальный цикл в основной группе определен только в 7 случаях (23,3%). В группе сравнения частота изучаемых показателей была сопоставима: нормогонадотропная нормопролактинемическая недостаточность яичников (67,7%), ановуляция (33,3%), у остальных - недостаточность лютеиновой фазы, $p > 0,05$. Достаточный двухфазный менструальный цикл в группе сравнения определен у 10 женщин (32,3%), $p > 0,05$. Овариальный резерв оценивали по следующим параметрам, представленным в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика овариального резерва у женщин обследуемых групп.

Исследуемые параметры	Основная группа n=28	Группа сравнения n=28	Референсные значения (лаборатория БиоТехМед)	p
ФСГ (мМЕ/мл)	8,21±1,1	6,89±0,84	1,8-11,3	>0,05
АМГ (нг/мл)	1,98±0,46	4,41±0,6	1-12,6	<0,01
Ингибин В (нг/мл)	88,60±8,51	114,91±5,51	0-10 – низкий 10-45 – промежуточный 45-240 – нормальный	<0,05
Объем правого яичника, см ³	6,23±0,16	8,32±1,0		>0,05
Количество фолликулов правого яичника, n	5,96±0,5	7,16±0,36		>0,05
Диаметр максимального фолликула правого яичника, мм	6,61±0,36	7,65±0,38		<0,05
Объем левого яичника, см ³	5,27±0,08	9,26±0,9		<0,05
Количество фолликулов в левом яичнике	6,14±0,45	6,81±0,41		>0,05
Диаметр максимального фолликула левого яичника, мм	6,45±0,33	7,01±0,15		>0,05

Как видно из таблицы 1, несмотря на то, что в обеих группах содержание АМГ составило больше его минимального порогового значения, в основной группе его уровень был значимо ниже, чем у женщин из группы сравнения ($p < 0,01$), а у 12 женщин (42,8%) был меньше единицы, тогда как в группе сравнения - лишь у двух (7,1%), $p < 0,01$. Уровень Ингибина В, объем и диаметр максимального фолликула в левом яичнике также были значимо ниже у женщин основной группы ($p < 0,05$). Остальные параметры в группах больных достоверно не различались.

По результатам ГСГ у женщин основной группы достоверно чаще выявлялась двусторонняя окклюзия маточных труб (рисунок 2).

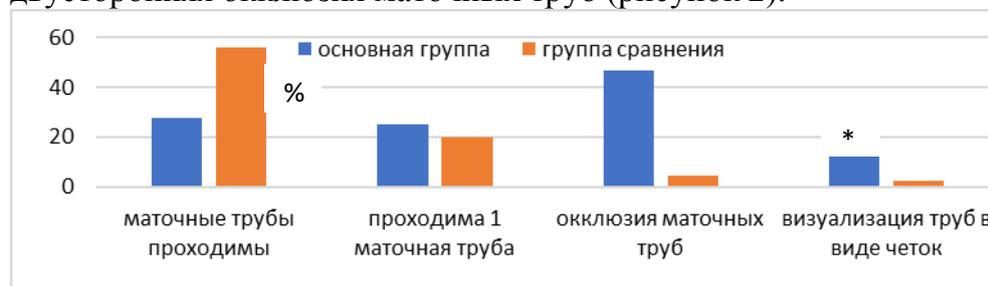


Рисунок 2 - Оценка состояния маточных труб по результатам ГСГ у женщин обследуемых групп.

УЗИ органов малого таза проведено всем обследованным женщинам. МРТ органов малого таза выполнено 98 (76,3%) женщинам основной группы и 112 (86,8%) из группы сравнения. При проведении МРТ и УЗИ органов малого таза основными «находками» с одинаковой межгрупповой частотой ($p > 0,05$) являлись: наличие свободной жидкости, жидкостные образования придатков (параовариальные кисты, гидросальпинксы, кисты яичников), увеличение паховых и подвздошных лимфатических узлов, ($p > 0,05$ по результатам УЗИ и МРТ).

Внутрикожная проба с АРТ проведена 63 женщинам основной группы и 125 - из группы сравнения. Положительная реакция наблюдалась соответственно у 44,4% и у 4,8% женщин ($p < 0,001$). Среди больных женщин средний размер папулы составил $8,7 \pm 1,5$ мм, максимальный - до 55 мм с признаками некроза, в группе сравнения - не превышал $1,8 \pm 0,4$ мм. При этом у 25 обследованных из основной группы с положительной пробой отсутствовали указания на перенесенный туберкулез других локализаций в анамнезе, а две женщины из группы сравнения указали на перенесенный туберкулез легких и внутригрудных лимфатических узлов.

Лапароскопия выполнена 83 (63,4%) женщинам основной группы, в группе сравнения - 96 (74,4%) пациенткам ($p > 0,05$). В процессе операции проводили диагностику и коррекцию сопутствующей гинекологической патологии (рисунок 3). У женщин из группы сравнения встречаемость НГЭ была значимо выше ($p < 0,05$). Встречаемость миомы матки опухолей и опухолевидных образований яичников в группах обследованных больных достоверно не различались ($p > 0,05$). Спаечный процесс органов малого таза в основной группе выявлен у 60 женщин (72,3% от общего числа проведенных лапароскопий) и у 30 (31,3%) - в группе сравнения, $p < 0,001$; брюшной полости - у 9 (10,8%) и 23 (23,9%) пациенток, соответственно, $p > 0,05$. Степень выраженности спаечного процесса варьировала (рисунок 4). У женщин основной группы в 2 раза чаще выявлялся спаечный процесс органов малого таза ($p < 0,05$), причем степень его распространения и тяжести была достоверно выше ($p < 0,01$). Достоверно чаще в основной группе встречался синдром Фитц-Хью-Куртиса и двусторонние сактосальпинксы $p < 0,01$, $p < 0,001$, соответственно)

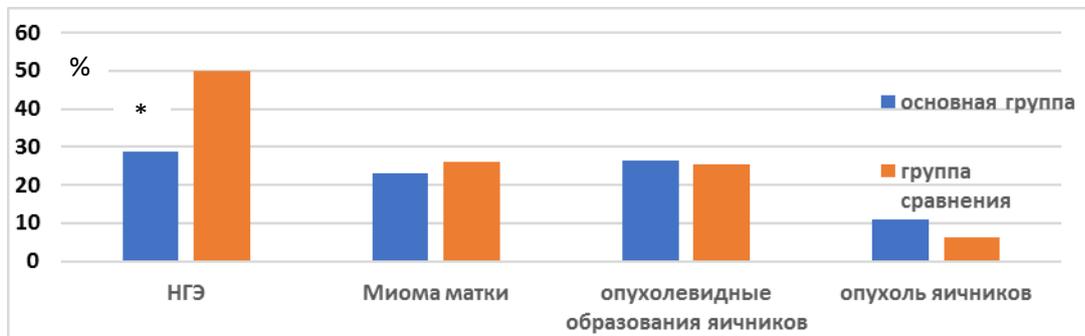


Рисунок 3 - Гинекологические заболевания, выявленные в процессе лапароскопии у женщин обследуемых групп.



Рисунок 4 - Особенности спаечного процесса в области малого таза и брюшной полости у женщин обследуемых групп.

В одном случае выявлен активный туберкулез половых органов (определялись казеомы маточных труб, многочисленные туберкулезные бугорки, органы малого таза находились в едином рыхлом конгломерате), в посевах операционного материала выявлены ЛУ МБТ. По результатам бактериологического исследования операционного материала в данном клиническом случае была определена лекарственная устойчивость МБТ. В связи с отличиями в структуре выявляемых заболеваний у женщин основной группы хирургические вмешательства достоверно чаще выполнялись в объеме двусторонней тубэктомии ($p < 0,001$) и адгезиолизиса ($p < 0,001$) по поводу гидросальпинкса и рубцово-спаечного процесса в области малого

таза, а в группе сравнения чаще проводилась коагуляция и иссечение эндометриодных гетеротопий ($p < 0,05$).

Гистероскопия с прицельной биопсией эндометрия выполнена 70 женщинам основной группы и 119 - из группы сравнения, гистерорезектоскопия в 33 и 45 случаях, соответственно. Показаниями к гистерорезектоскопии в основной группе и в группе сравнения соответственно являлись: полипы эндометрия и цервикального канала (22,9% и 24,4%, $p > 0,05$), субмукозная миома матки (2,8% и 1,2%, $p > 0,05$), синехии полости матки (15,7% и 1,7%, $p < 0,05$). Нормальные гистероскопические данные имела 31 (44,3%) женщина основной группы и 48 (40,3%) - из группы сравнения, $p > 0,05$. Визуальные признаки хронического эндометрита обнаруживались у 34,3 % женщин основной группы и у 34,1% - из группы сравнения, $p > 0,05$, в последующем подтвержденные результатами гистологического исследования. Спаечный процесс полости матки обнаружен у 11 женщин, перенесших туберкулезную инфекцию половых органов (15,7%), и у 2 (1,7%) - из группы сравнения, $p = 0,000$ (таблица 2). Причем достоверно чаще у женщин основной группы определялась 2 и 3 ст спаечного процесса ($p < 0,05$, $p < 0,05$, соответственно). При сравнительном анализе по показателю спаечного процесса полости матки у женщин с бесплодием, синехии обнаруживались у 9,8% - из основной группы и у 2,1% - из группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 2 - Особенности спаечного процесса в полости матки у женщин, пролеченных по поводу туберкулеза половых органов и в группе сравнения

Спаечный процесс	Основная группа (n=70)		Группа сравнения(n=119)		p
	Абсолютное количество	%	Абсолютное количество	%	
Синехии 1 ст	4	5,7	2	1,7	$>0,05$
Синехии 2 ст	3	4,3	0	0	$<0,05$
Синехии 3 ст	4	5,7	0	0	$<0,05$

Ассоциации микроорганизмов, выявляемых в цервикагинальном содержимом у 66 (50,4%) женщин основной группы и у 67 (52%) из группы сравнения соответствовали нормоценозу. Умеренный дисбиоз с выявлением *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus spp.*, *E. coli* при незначительном снижении титра лактобактерий обнаружен у 16 (12,2%) женщин основной группы и у 15 (11,6%) больных из группы сравнения ($p > 0,05$). В результате микробиологического исследования биоптатов эндометрия отрицательные результаты посевов на неспецифическую флору выявлены у 70 (53,4%) женщин основной группы и у 90 (69,8%) - из группы сравнения ($p > 0,05$). Только у женщин основной группы в полости матки определялись: *Staphylococcus aureus* – (1,6%), *Klebsiella spp.* – (1,6%), *Candida albicans* – (7,7%), в то же время в цервикагинальном отделяемом вышеуказанные микроорганизмы у этих больных обнаружены не были. Следует отметить, что у женщин основной группы чаще определялись положительные результаты микробиологического исследования эндометрия, чем в группе сравнения, установлено достоверное преобладание кишечной условно-патогенной микрофлоры (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*).

В результате гистологического исследования биоптатов и соскобов эндометрия в основной группе и группе сравнения помимо хронического эндометрита (51,4% и 35,3%, $p < 0,05$) определялись соответственно: гиперплазия эндометрия (35,7% и 31,05, $p > 0,05$), полипы эндометрия (1,4% и 5,9%, $p > 0,05$), полипы цервикального канала (1,4% и 5,9%, $p > 0,05$). Иммуногистохимическое исследование биоптатов

эндометрия выполнялось 30 женщинам основной группы и 30 женщинам группы сравнения репродуктивного возраста на 19-22 дни спонтанного овуляторного менструального цикла, подтвержденного гормонально и морфологически (таблица 3). Таблица 3 - Результаты иммуногистохимического исследования эндометрия у женщин, пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, и в группе сравнения

Маркер (кл/п.зр)	Основная группа n=30	Группа сравнения n=30	Норма [L.D. Klentzeris.,1994, A.King, 1998].	p
CD56+	30,2±4,8	14,9±2,3	До 10	<0,05
CD16+	24,8±2,9	17,6±2,2	До 10	<0,05
CD20+	3,4±1,0	4,3±1,8	До 3	>0,05
CD138+	1,8±0,5	3,3±0,6	0	>0,05
HLA-DRII	18,9±1,9	22,3±1,8		>0,05

Частота выявления экспрессии маркера воспалительных процессов в эндометрии CD138+ среди женщин основной группы составила 47,6% и достоверно не отличалась от аналогичного показателя у женщин из группы сравнения (67%), $p > 0,05$. У 42,8 % больных основной группы обнаружена повышенная инфильтрация эндометрия CD56+ и CD16+, что свидетельствует о наличии в эндометрии большого количества лимфоцитов с высокой цитотоксической активностью. В процессе иммуногистохимического исследования параллельно проводилось также определение количества рецепторов стероидных гормонов в железах и строме эндометрия (таблица 4).

Таблица 4 - Содержание рецепторов стероидных гормонов в железах и строме эндометрия у женщин, пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, и в группе сравнения

Данные гистологического исследования	Основная группа, n=30				Группа сравнения, n=30			
	строма		железы		строма		железы	
	ER,%	PgR,%	ER,%	PgR,%	ER,%	PgR,%	ER,%	PgR,%
Средняя фаза секреции	80,90 ±2,5	87,00 ±1,6	82,00 ±3,1	87,32 ±1,60	82,00 ±3,1	85,30 ±0,6	83,93 ±0,37	88,40 ±1,9
Поздняя фаза секреции	82,74 ±1,08	87,00 ±1,44	82,00 ±2,5	87,11 ±2,60	85,00 ±2,41	89,20 ±0,3	83,80 ±2,1	89,60 ±1,4

Примечание: $p > 0,05$ для всех исследуемых параметров.

Отмечено высокое количество эстрогеновых рецепторов как в строме, так и в железах эндометрия в среднюю и позднюю секреторную фазу менструального цикла, практически не отличающееся от количества прогестероновых рецепторов в группах обследованных женщин.

Проведен логистический регрессионный анализ, куда были включены переменные, имеющие максимальную корреляционную связь с фактом генитального туберкулеза у женщин и выделенные на основании значений коэффициента Спирмена, а именно: наличие в анамнезе указаний на диспареунию, альгоменорею, длительный субфебрилитет неясной этиологии, нарушение менструального цикла, проходимость маточных труб по результатам ГСГ, данные внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным. Разработанная на основе регрессионного логистического анализа математическая модель прогнозирования развития генитального туберкулеза является адекватной ($p = 0,000$, общая точность

модели составила 81,5%). Частота истинно-отрицательного прогностического результата для представленной модели составила 90,5%. При этом частота истинно-положительного прогностического результата составила 63,5%. Полученные результаты подтверждали построением ROC-кривой (рисунок 5). Величина площади под кривой (AUC) составила 0,885, что свидетельствует о высокой точности прогнозирования результатов при использовании данной математической модели.

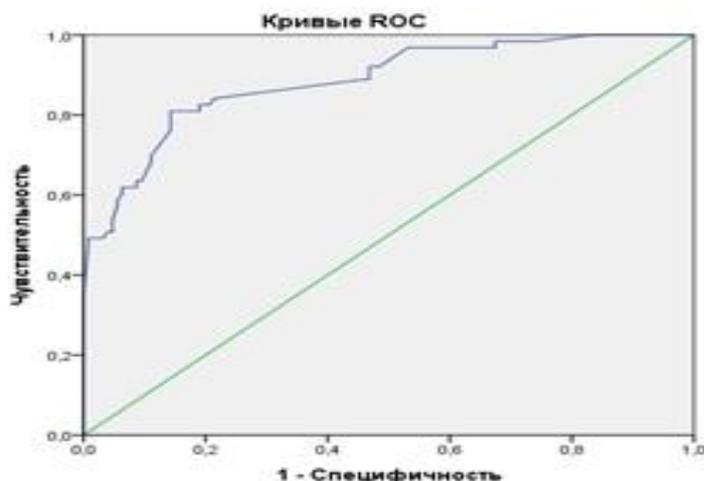


Рисунок 5 ROC-кривая для предложенной математической модели.

В четвертой главе диссертации описаны результаты экспериментальной части исследования. Процесс моделирования туберкулеза гениталий включал 5 этапов: 1 - предоперационная эстрогенизация животных 0,1% раствором синэстрола по 0,5 мл (через день курсом 4 процедуры); 2 - осуществление хирургического доступа; 3 - инокуляция суспензии тест-штамма *M. tuberculosis* Erdman (10^7 КОЕ/0,2 мл) с помощью инъекционной иглы, которую вводили под серозную оболочку левой маточной трубы снаружи (не входя в ее просвет) в точке, отстоящей от маточного рога на 5 см; в месте введения образуется папула до 0,3 см; 4 - послойное ушивание раны; 5 - послеоперационный период, где со 2 по 6 сутки через день продолжен курс эстрогенизации кроликов (0,1 % р-р синэстрола) и профилактики инфекционных осложнений (цефамезин, 5 дней).

Через 30 дней после инокуляции МБТ в ответ на внутрикожное введение АТР у зараженных кроликов регистрировали положительный результат теста в виде эритемы размером $18,5 \pm 1,5$ мм ($p < 0,0001$); у всех 6 интактных животных отмечалась отрицательная реакция. В этот же период при сравнительной оценке гематологических и биохимических показателей периферической крови подопытных животных 1 и 2 групп количество лейкоцитов, показателей лейкоцитарной формулы, эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина в группах животных статистически не различались ($p > 0,05$). Не отмечено и достоверного повышения СОЭ ($p > 0,05$). Не было выявлено различий большинства средних биохимических показателей в интактной и подопытной группах при сравнении до и через 30 дней наблюдения ($p > 0,05$). В периферической крови зараженных кроликов регистрировали повышение величины С-реактивного белка (с $0,6 \pm 0,6$ до $10,8 \pm 2,8$ мг/л, $p < 0,001$), что наряду с положительной пробой с АТР подтверждало развитие туберкулеза. При проведении МС КТ легких на

этом же сроке подопытным животным обеих групп патологических изменений не выявлялось.

Через 60 дней после инфицирования у животных группы контроля при ревизии брюшной полости определялись отечность, выраженная гиперемия и расширение ампулярного отдела маточной трубы на стороне инфицирования (рисунок 6). В посевах гомогенатов слизистой оболочки выявлялись МБТ.

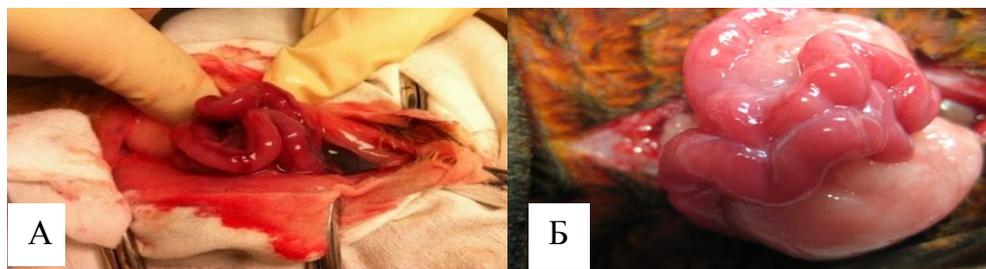


Рисунок 6 – Левая маточная труба самки кролика через 60 дней после заражения: А – интактный, Б – зараженный кролик.

При повторной ревизии брюшной полости через 150 дней у кроликов группы контроля заражения выявляли рыхлые и плоскостные спайки, облитерацию маточных труб, деформацию левых маточных труб с образованием в 50% случаев сактосальпинксов; в просвете труб определялись казеозные массы. При гистологическом исследовании в мышечном слое сохранялись признаки специфического воспаления в виде единичных продуктивных туберкулезных эпителиоидноклеточных гранулем с гигантскими многоядерными клетками (рисунок 7).



Рисунок 7 – Левая маточная труба самки кролика через 150 дней после заражения: А - гидросальпинкс с инфицированной маточной трубой; Б – гистологическая картина слизистой оболочки. Продуктивная туберкулезная эпителиоидно-клеточная гранулема с гигантскими многоядерными клетками в мышечном слое. Окраска гематоксилином и эозином, х400.

Во 2-й серии опытов данная модель была использована для оценки влияния МСК на эффективность ПТП. У кроликов 2-й группы (контроль заражения) развивался тяжелый туберкулезный пансальпингит с облитерацией просвета маточных труб на всем протяжении, что подтверждалось положительными посевами гомогенатов слизистой оболочки, а также положительной пробой с АТР с наличием сенсibilизации уже с 30 дня после заражения и сохраняющегося до 150 дня (завершение эксперимента); величина эритемы была достоверно в 5 раз выше, чем у животных, получавших только ПТП, и в 17,5 раз - по сравнению с кроликами, которым трансплантировали МСК (рисунок 8).

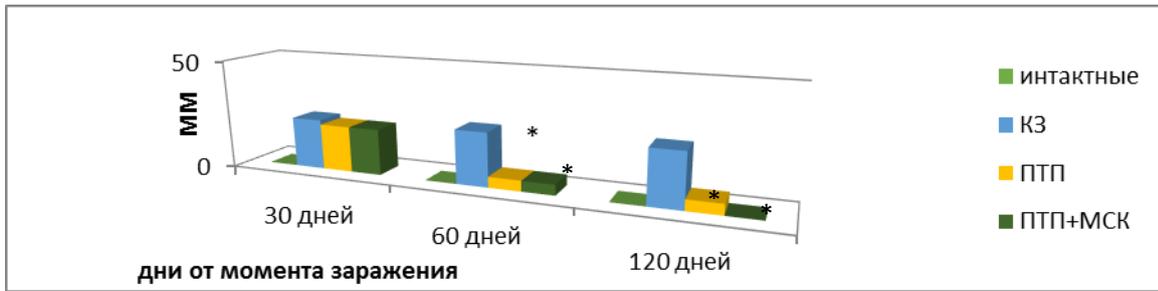


Рисунок 8 - Средний размер эритроцит (мм) в ответ на введение АТР кроликам на разных сроках ПХТ: *- достоверность по отношению к контролю заражения ($p < 0,05$).

В группе контроля заражения содержание лейкоцитов и величина СОЭ достоверно превышали в течение всего эксперимента показатели в опытных группах; на завершающем этапе количество лейкоцитов было в 1,4 - 1,6 раза ($p < 0,05$), а величина СОЭ - в 2,1-2,3 раза ($p < 0,05$) больше по сравнению с данными у кроликов 4 и 3 групп (соответственно). Кроме того, в группе контроля заражения отмечен стабильно высокий уровень С-реактивного белка на протяжении всего периода наблюдения, составивший к концу эксперимента $13,75 \pm 2,0$ г/л против $2,2 \pm 1,2$ г/л - в группе 3 (ПТП) и $1,1 \pm 0,8$ г/л - в группе 4 (ПТП+МСК) ($p < 0,01$, рисунок 9).



Рисунок 9 - Динамика уровня С-реактивного белка в группах модельных животных на разных сроках наблюдения. Примечание: * - $p < 0,01$ между группой контроля заражения и животными подопытных групп.

Через 150 дней от момента инфицирования у животных группы контроля заражения при лапаротомии определялся выраженный рубцово-спаечный процесс в половых органах, а также в половине случаев - образование гидросальпинксов. При ГСГ выявлена двусторонняя окклюзия маточных труб. При микроскопическом исследовании в стенке инфицированной маточной трубы обнаруживались тяжелые некротические изменения (рисунок 10, а). При окраске по Цилю-Нельсену были выявлены кислотоупорные формы бактерий в казеозных массах пораженного маточного рога (преимущественно в цитоплазме погибших макрофагов), а также специфические грануляции в стенке маточного рога (рисунок 10 б).

Под влиянием ПТП у кроликов 3-й группы показатели активности специфической инфекции существенно снизились: через 90 дней от момента заражения в посевах не определялись МБТ; уменьшился средний размер эритроцит в пробе с АТР до $4,9 \pm 1,0$ мм против $21,0 \pm 1,3$ мм на сроке 60 дней ($p \leq 0,05$). Определялось снижение лейкоцитов и содержания С-реактивного белка соответственно с $14,95 \pm 5,31$ ($10^9/\text{л}$) и $13,7 \pm 2$ мг/мл в контроле заражения до $8,71 \pm 1,4$ ($p < 0,05$) и $3,5 \pm 1,3$ мг/мл ($p < 0,01$). Уровень СРБ к 120 дню эксперимента уменьшился в 1,6 раза.

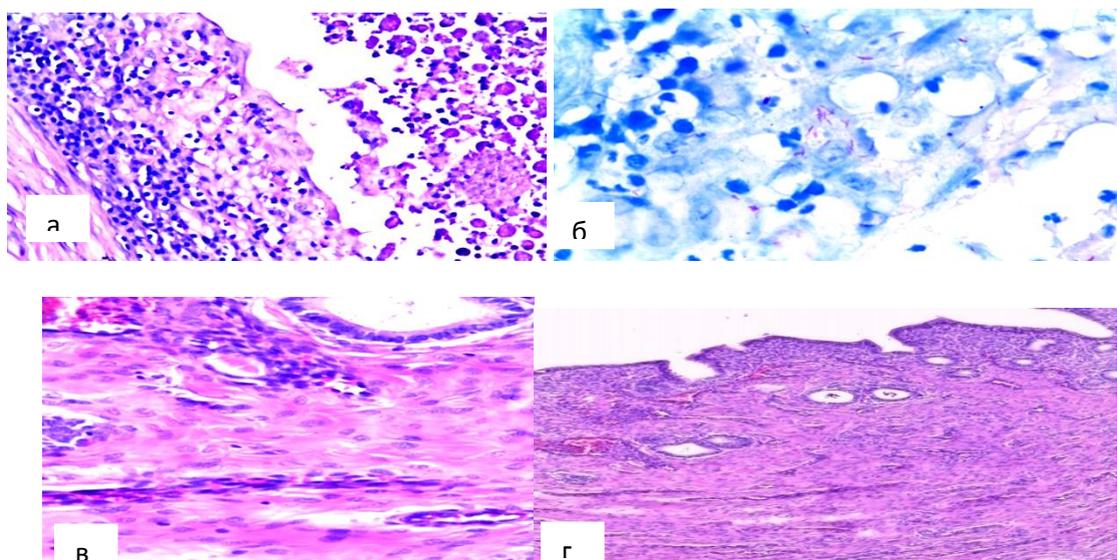


Рисунок 10 - Стенки маточной трубы через 5 месяцев после заражения; а - тяжелые некробиотические изменения у кролика КЗ. Окр. гематоксилином и эозином. Х450; б – большое количество микобактерий в некротических массах. Окр. по Цилю-Нельсену. Х1100; в - разрастание миофибробластов в собственной пластинке слизистой оболочки через 4 месяца терапии. Окр. гематоксилином и эозином. Х450; г - тяжи клеток типа фиброцитов и аморфный амфотильный неклеточный матрикс в мышечной и серозной оболочке трубы через 4 месяца терапии ПТП. Окр. гематоксилином и эозином. Х280.

При лапароскопии животных, получавших ПТП, определялся умеренный спаечный процесс половых органов, не обнаружены грубые деформации маточных труб, признаки инфильтрации, казеозного некроза. При проведении ГСГ отмечена частичная проходимость маточных труб. При гистологическом исследовании срезов тканей маточного рога наблюдалось уменьшение признаков воспалительной реакции. Не выявлено некробиотических изменений эпителиального пласта, гранулематозной реакции и микобактерий. В то же время во всех слоях стенки трубы выявлено избыточное фиброзирование. В слизистой оболочке - формирование грубых сосочковых структур с фиброзированной стромой и разрыхленным, частично истонченным эпителием. Собственная пластинка была утолщенной за счет разрастания крупных многоотростчатых клеток типа миофибробластов со светлой однородной цитоплазмой и средних размеров ядрами, местами соединяющихся отростками в своеобразный синцитий (рисунок 10 в). Определялись тяжи клеток типа зрелых фиброцитов, ориентированных вдоль пучков новообразованных коллагеновых волокон разной толщины. Обнаружен аморфный амфотильный неклеточный матрикс с единичными атрофичными железами и мелкими сосудами с утолщенной гомогенизированной стенкой, что характерно для грануляционной ткани (рисунок 10 г). Клеточные скопления и волокнистые структуры ориентировались местами хаотично, местами – в виде циркулярных тяжей, идущих параллельно мышечным волокнам внутреннего слоя.

Трансплантация МСК кроликам 4-й группы на 90 день после заражения способствовала повышению эффективности, проводимой ПХТ. При этом на 150-й день после инфицирования регистрировали достоверное уменьшение размера эритем по АТР в 7 раз (рисунок 8), достоверное снижение в 2 раза уровня С-реактивного белка (рисунок 9) и содержания лейкоцитов в 1,2 раза по сравнению с животными, получавшими только ПТП. Применение МСК сопровождалось достоверным

повышением поглотительной способности перитонеальных макрофагов по ФА в 1,3 раза (до $43,8 \pm 3,0\%$ против $33,7 \pm 2,7\%$ в контроле заражения, $p < 0,05$), переваривающей способности по ПЗФ - в 1,8 раза (до $67,8 \pm 5,1$ дрожжевых клеток против $37,0 \pm 4,5$, $p < 0,05$) практически до уровня интактных животных. Стимулирующее действие МСК на фагоцитоз, ингибированный у кроликов с туберкулезом половых органов, возможно, свидетельствует о восстановлении субпопуляционного баланса Th1 и Th2 в сторону преобладания Th1 лимфоцитов, которые продуцируют IFN- γ - один из важнейших путей активации макрофагов. У животных обсуждаемой группы наблюдалась явная тенденция к стабилизации спаечного процесса, представленного единичными рыхлыми узкими спайками без деформации передней брюшной стенки и маточных труб. При проведении ГСГ определялась проходимость обеих маточных труб. Реакция альтерации в области инфицированной маточной трубы протекала менее агрессивно, сохранились объем и рельеф ампулярного отдела маточной трубы без признаков инфильтрации. В глубоких слоях подслизистой оболочки определялись тонкие, рыхло расположенные коллагеновые волокна и нежнобазофильный бесклеточный матрикс, на фоне которого выделялись фибробласты и немногочисленные миофибробласты. При статистическом анализе морфометрических параметров половых органов отмечали достоверные различия у кроликов 4-й группы в сравнении с животными 2-й группы: увеличение сосудов СО подушки - в 2 раза ($p < 0,001$); количества фибробластов - в 1,3 раза ($p = 0,09$), толщины ПО - в 3,8 раза ($p < 0,001$), уменьшение инфильтрации нейтрофилами - в 1,2 раза ($p = 0,06$). Конфокальная микроскопия криосрезов через 150 дней показала инкорпорацию маркированных жизнеспособных МСК в различные слои стенки маточной трубы (рисунок 11).

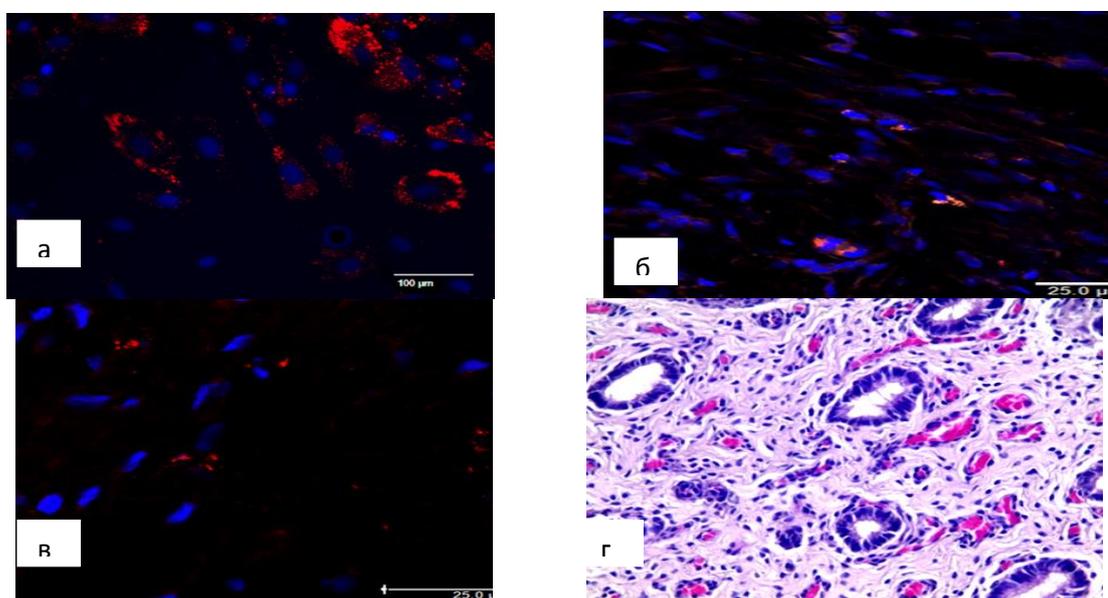


Рисунок 11 - Стенки маточной трубы кролика 4 группы (через 150 дней после инокуляции микобактерий): а-в – конфокальная микроскопия (ядра синего цвета); X40; г - окраска гематоксилином и эозином. X450; а - МСК в монослое *in vitro* окр.РКН-26 (Scalebar: 100 μm); б, в - МСК в криосрезях маточной трубы (Scalebar: 25 μm); г – единичные железистоподобные образования в серозной оболочке, состоящие из секреторных и реснитчатых клеток; окр. гематоксилином и эозином. x250.

Таким образом, на разработанной модели туберкулезного сальпингита показано, что сочетание специфической химиотерапии с трансплантацией в пораженный орган МСК, позволяет купировать туберкулезный процесс, направив его

в сторону репарации с более или менее полной нормализацией структуры и функции труб.

ВЫВОДЫ

1. У 77,9% женщин, эффективно пролеченных по поводу генитального туберкулеза, определяются структурно-функциональные нарушения органов малого таза: нормогонадотропная недостаточность яичников (у 76,7%), спаечная болезнь органов малого таза и окклюзия маточных труб (у 54,2%), хронический эндометрит, спаечная болезнь полости матки (у 15,7%). Лапаро- и гистероскопия являются информативными методами обследования у женщин после окончания терапии туберкулеза половых органов, позволяющими определить последствия перенесенной инфекции в органах репродуктивной системы и провести хирургический этап лечения.
2. Сниженный овариальный резерв наблюдается у 42,85% женщин, эффективно пролеченных по поводу туберкулеза половых органов, и проявляется значимым уменьшением уровня АМГ в периферической крови.
3. Точность разработанной математической модели прогнозирования развития генитального туберкулеза у женщин из группы риска, включающая результаты внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным и гистеросальпингографии, клинико-anamнестические данные, достигает 81,5% при частоте истинно-отрицательного прогностического результата 90,5%, истинно-положительного 63,5%.
4. При инокуляции лабораторным животным (кроликам) микобактериальной суспензии в ампулярный отдел маточной трубы развивается типичный туберкулезный пансальпингит, протекающий по типу первичного туберкулеза. Однократное локальное введение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга через 3 месяца противотуберкулезной терапии кроликам с туберкулезной инфекцией половых органов снижает степень сенсбилизации и активность специфического воспалительного процесса, предотвращает деформацию ампулярного отдела маточной трубы, способствует восстановлению ее структурно-функциональной целостности, препятствует раннему фиброзированию и обеспечивает реэпителизацию внутренней выстилки маточной трубы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При первичном обследовании женщин из группы риска по туберкулезу половых органов и женщинам, перенесшим экстрагенитальные формы туберкулеза, оценка риска развития генитального туберкулеза может быть проведена по совокупности показателей: характеристика менструального цикла, нарушение менструального цикла (в виде гипо-олигоменореи), результаты гистеросальпингографии (одно или двусторонняя окклюзия маточных труб) и положительные результаты внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным в формате математической модели.
2. Женщинам, планирующим беременность после окончания специфической полихимиотерапии по поводу туберкулеза половых органов, целесообразно проводить эндоскопическое обследование (лапаро- и гистероскопию) с целью контроля эффективности проведенного лечения, оценки состояния органов

репродуктивной системы и выполнения хирургического этапа восстановительного лечения при необходимости.

3. Планирование сроков и методов преодоления бесплодия у женщин, перенесших туберкулез половых органов и специфическую полихимиотерапию целесообразно проводить с учетом предполагаемого изменения микробиоты полости матки в сторону преобладания условно-патогенной микрофлоры, снижения овариального резерва и иммуногистохимической характеристики эндометрия (развития хронического эндометрита, нарушения рецептивности эндометрия).

4. Разработанная методика формирования модели изолированной туберкулезной инфекции половых органов в экспериментальных условиях является адекватной для визуальной, морфологической и морфометрической характеристики развития специфического инфекционного процесса в динамике и оценки эффективности терапевтического влияния мезенхимальных стромальных клеток. Модель может быть пригодна для проведения дальнейших исследований фтизиатрами, акушерами-гинекологами, репродуктологами, морфологами, специалистами в области клеточной биологии, цитологии и гистологии.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведенное диссертационное исследование не исчерпывает всей глубины проблемы нарушений репродуктивной функции у женщин, перенесших туберкулез половых органов. Важным направлением дальнейших исследований является углубленный анализ гормональных изменений у женщин, перенесших генитальный туберкулез, оценка изменения клеточного состава эндометрия и его рецептивности в процессе развития специфического воспаления, а также возможность применения клеточного продукта на основе МСК для коррекции вышеназванных нарушений. Необходимо более подробно изучить отдаленные результаты проведенного лечения, а именно: частоту наступления спонтанной беременности и эффективность различных методов ВРТ для данной категории больных.

**СПИСОК РАБОТ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Публикации в научных рецензируемых изданиях из Перечня рекомендованных
ВАК Министерства науки и образования РФ**

1. Гусейнова, Ф.М. Первый опыт применения стромальных клеток костного мозга в терапии экспериментальной туберкулезной инфекции женских половых органов / **Ф.М. Гусейнова**, Д.А. Ниаури, Т.И. Виноградова, Н.М. Юдинцева, А.А. Муртузалиева, Н.М. Блюм, Д.С. Момот, Н.В. Заболотных, М.Л. Витовская, Т.В. Кольцова, П.К. Яблонский // Таврический медико-биологический вестник. - 2015. - Т. 18, № 1. - С. 22-26.

2. Гусейнова, Ф.М. Особенности нарушения репродуктивной функции женщин, больных генитальным туберкулезом / **Ф.М. Гусейнова**, Д.А. Ниаури, Т.И. Виноградова, Т.В. Кольцова, А.М. Гзгзян, Л.Х. Джемлиханова, П.К. Яблонский // Медицинский альянс. - 2017. - № 4. - С. 57-66.

3. Гусейнова, Ф.М. Влияние клеточной терапии мезенхимными клетками стромы костного мозга на процессы репарации при экспериментальном туберкулезном сальпингите / **Ф.М. Гусейнова**, Т.И. Виноградова, Н.В. Заболотных, Б.М. Ариэль, Д.А. Ниаури, Н.М. Юдинцева, М.Л. Витовская, П.К. Яблонский // Медицинский альянс. - 2017. - № 3. - С. 35-44.

4. Ариэль, Б.М. Мезенхимные клетки стромы костного мозга при туберкулезе гениталий у кроликов (экспериментальное исследование с морфологическим контролем) / Б.М. Ариэль, **Ф.М. Гусейнова**, Т.И. Виноградова, Н.В. Заболотных, Д.А. Ниаури, Н.М. Юдинцева, М.Л.

Витовская, М.З. Догондзе, О.Л. Рубцова, П.К. Яблонский // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* - 2017. - Т. 15, № 2.- С. 47-55.

Патент на изобретение

5. Патент на изобретение РФ 2600926. Способ моделирования туберкулеза женских половых органов / **Ф.М.Гусейнова**, Д.А.Ниаури, Т.И.Виноградова, П.К.Яблонский, А.А.Муртузалиева, Н.В.Заболотных, М.Л. Витовская, А.М.Гзгзян, Л.Х. Джемлиханова // Заявка № 201511197914/ 018646, решение о выдаче патента от 08.08.2016. Опубл. 27.10.2016. Бюл. №301.

Публикации в материалах научно-практических мероприятий

6. Гусейнова, Ф.М. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на репарацию поврежденных тканей при экспериментальной туберкулезной инфекции женских половых органов (предварительные данные) / **Ф.М. Гусейнова**, Д.А.Ниаури, Т.И. Виноградова, Н.М. Юдинцева, Б.М. Ариэль, М.Л. Витовская, Н.В. Заболотных, Т.В. Кольцова, Е.О. Усольцева, М.З. Догондзе // *Медицинский альянс.* - 2015. - № 1. - С. 65-66.

7.Гусейнова Ф.М., Виноградова Т.И., Ниаури Д.А., Гзгзян А.М., Джемлиханова Л. Х. Показатели овариального резерва у женщин с туберкулезной инфекцией гениталий/ **Ф.М. Гусейнова**, Т.И. Виноградова, Д.А.Ниаури, А.М. Гзгзян, Л.Х. Джемлиханова// IV Конгресс национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (19-21 ноября 2015 г.): тез. докл. - СПб., 2015. - С.255-256.

8. Гусейнова Ф.М. Доклиническая оценка эффективности мезенхимальных стромальных клеток в комплексной терапии туберкулеза женских гениталий /**Ф.М. Гусейнова**, Д.А.Ниаури, Т.И. Виноградова, Н.М. Юдинцева, Б.М. Ариэль, М.Л. Витовская, Н.В. Заболотных, Т.В. Кольцова, Е.О. Усольцева, М.З. Догондзе // IV Конгресс национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (19-21 ноября 2015 г.): тезисы докладов. - СПб., 2015. - С. 108-110.

9. Гусейнова Ф. М. Оценка овариального резерва у женщин с туберкулезной инфекцией гениталий / **Ф.М. Гусейнова** // *Фундаментальная наука и клиническая медицина — Человек и его здоровье: Тезисы XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ.* — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2015. — С.152. ISSN 2221–5654

10. Гусейнова Ф. М. Клинический анализ нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с генитальным туберкулезом / **Ф.М. Гусейнова** // *Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XIX Международной медико- биологической конференции молодых исследователей.* — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2016. — С.177-178

11. Guseinova F.M. The efficacy of mesenchymal stem cells in complex therapy of female genital tuberculosis (preclinical results) / **F.M. Guseinova**, D.A.Niauri, T.I.Vinogradova, B.M.Ariel // 5th Annual International Scientific-Practical Conference "Medicine Pressing Questions", April 29-30 2016, Baku, Azerbaijan. - Medical review. - 2016. - Vol.3. - P.139-140

12. Гусейнова Ф.М., Ариэль Б.М., Виноградова Т.И., Ниаури Д.А., Заболотных Н.В., Витовская М.Л., Юдинцева Н.М., Догондзе М.З., Рубцова О.Л. Эффективность трансплантации мезенхимных клеток стромы костного мозга в терапии туберкулеза женских гениталий у кроликов (экспериментально-морфологическое исследование) // V Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (17-19 ноября 2016 г. Санкт-Петербург) [Электронный ресурс]: тезисы докладов / под ред. П.К. Яблонский. – СПб. 2016. - 1 электрон.опт.диск [CD-ROM].

13. Гусейнова Ф.М., Гзгзян А.М., Ниаури Д.А., Виноградова Т.И., Кольцова Т.В. Состояние эндометрия у женщин с туберкулезной инфекцией гениталий // V Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (17-19 ноября 2016 г. Санкт-Петербург) [Электронный ресурс]: тезисы докладов / под ред. П.К. Яблонский. – СПб. 2016. - 1 электрон.опт.диск [CD-ROM]. - URL

14. Гусейнова, Ф.М. Лапароскопия и гистероскопия в диагностике и комплексном лечении туберкулезного поражения женских половых органов / **Ф.М. Гусейнова** // Фтизиатрия и пульмонология. - 2017. – Т. 15, № 2. - С. 14-15.
15. Гусейнова, Ф.М. Структура нарушения репродуктивной функции женщин, больных генитальным туберкулезом / Ф.М. Гусейнова, Д.А. Ниаури // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т.15, №2. – С.21
16. Guseinova, F. Efficacy of transplantation of bone marrow stromal mesenchymal cells in the therapy of female genital tuberculosis in rabbits(experimental-morphological study)/ **F. Guseinova**, T. Vinogradova, D. Niauri // The 18 World Congress gynecological endocrinology 7-10 March 2018, Florence, Italy. – P.233
17. Guseinova, F. The characteristics of disorders of reproductive function in women with genital tuberculosis / **F. Guseinova**, D. Niauri, T. Vinogradova // The 18 World Congress gynecological endocrinology 7-10 March 2018, Florence, Italy. – P.233
18. Гусейнова, Ф.М. Ошибки диагностики генитального туберкулеза при врожденных аномалиях развития матки (описание клинических случаев) / **Ф.М. Гусейнова**, Т.В. Кольцова // Медицинский альянс. – 2017. - №3. – С.58-63.
19. Гусейнова, Ф.М. Роль эндоскопии в алгоритме обследования и лечения женщин, перенесших туберкулез гениталий / **Ф.М. Гусейнова** // Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XX Международной медико- биологической конференции молодых исследователей. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2017. — С.157-158

Список сокращений

- АИТ – Аутоиммунный тиреоидит
- АМГ – Антимюллеровский гормон
- АТР – аллерген туберкулезный рекомбинантный
- ВРТ – Вспомогательные репродуктивные технологии
- ГСГ – Гистеросальпингография
- ИППП – Инфекции, передающиеся половым путем
- МСК – Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга
- НГЭ – Наружный генитальный эндометриоз
- НПВС- Нестероидные противовоспалительные средства
- ПТП – Противотуберкулезные препараты
- ПО- Подсерозная основа маточного рога
- ПХТ- Полихимиотерапия
- СПКЯ – Синдром поликистозных яичников
- СО- Слизистая оболочка маточного рога
- ТПО – Тиреоидная пероксидаза
- ХГТ- Хромогидротубация