

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО АУТОИММУННОГО ПРОСТАТИТА

И.С. Цветков, В.А. Мхитаров

Учреждение Российской Академии Медицинских Наук Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва

**В эксперименте на крысах Вистар была воспроизведена модель хронического аутоиммунного простатита введением гомогената добавочных половых желез крыс. При морфометрическом и морфологическом исследовании гистологических препаратов предстательной железы были выявлены дистрофические и пролиферативные изменения эпителия ацинусов, воспалительная инфильтрация, очаговый фиброз. При иммунофлюоресцентном исследовании обнаружены депозиты IgG в базальной пластине эпителия ацинусов при обработке срезов простаты сывороткой крови крыс с хроническим простатитом. В культуральной жидкости спленоцитов, был снижен уровень ИЛ-4, ФНО- α .
Ключевые слова: хронический аутоиммунный простатит, экспериментальная модель, морфология, цитокины**

Хронический простатит - одно из самых распространенных заболеваний, встречающихся в урологической практике[1]. Патогенез хронического простатита, его морфологические проявления, роль иммунологических нарушений в механизмах развития изучены недостаточно. Исследования особенностей механизмов развития, течения и морфологических проявлений хронического простатита у человека ограничены из-за невозможности многократного проведения биопсийного исследования. Поэтому для изучения патогенетических механизмов развития хронического простатита используются экспериментальные модели. По данным клинико-лабораторных исследований у мужчин, страдающих хроническим простатитом в сыворотке крови выявляются антитела, к семеногелину (semenogelin) в 70% наблюдений а в биоптатах предстательной железы – в 100% [8]. Наиболее адекватной моделью хронического неинфекционного простатита является модель с введением гомогената добавочных половых желез крыс и адьюванта Фрейнда [4,7]. Несмотря на длительное использование этой модели, детальная характеристика иммуноморфологических нарушений и структурных изменений предстательной железы не проводилась, что в значительной мере ограничивает применение указанной модели для изучения патогенеза хронического простатита и доклинической оценки эффективности лечебных средств.

В связи с этим целью работы было изучение иммуноморфологических особенностей хронического простатита, вызванного введением гомогената добавочных желез с адьювантом Фрейнда.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 14 половозрелых крысах-самцах Вистар массой тела 220-300гг. Все эксперименты выполнены в осенне-зимний период. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии УРАМН НИИ морфологии человека РАМН. Контрольная группа была представлена интактными животными. Хронический простатит моделировали по В. Pacheco-Rupil (1984) путем трехкратного подкожного введения крысам гомогената добавочных половых желез крыс-самцов с адьювантом Фрейнда[5].

Добавочные половые железы помещали в физиологический раствор NaCl и гомогенизировали до однородной массы. Затем гомогенат центрифугировали при 14000 об/мин - 30 мин. Концентрация белка в супернатанте составила 11- 15 мг/мл. Полученный супернатант добавочных половых желез с адьювантом Фрейнда в равных объемах вводили подкожно в область холки трехкратно с интервалом в 7 сут.

Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Предстательную железу выделяли и помещали в фиксатор Буэна, затем проводили по спиртам восходящей концентрации, заливали в парафин.

В работе были использованы гистологические методы с окраской препаратов гематоксилином и эозином, толуидиновым синим с целью выявления тучных клеток. Индекс дегрануляции тучных клеток оценивали по методу Д.П. Линдер (1980). Морфометрическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500 с цифровой фотокамерой, изображение передавалось на экран монитора, на котором оценивали структурные изменения с помощью графического планшета и программы "Image Score".

Иммуноморфологическое исследование предстательной железы проводили с целью выявления участия в развитии хронического простатита аутоантител. На криостатный срез предстательной железы и печени интактных крыс наносили сыворотку крови крыс с хроническим простатитом в титре 1:400. В качестве контроля использовали срезы, на которые наносили фосфатный буфер или сыворотку крови интактных крыс контрольной группы в титре 1:400. В качестве «вторых» антител использовали меченные ФИТЦ-антитела козы против IgG крысы в титре 1:100 (ИМТЕК, Россия). Препараты просматривали на люминесцентном микроскопе Carl Zeiss Axioplan 2.

Для изучения цитокинового профиля из селезенки животных выделяли спленоциты. Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в количестве 5×10^6 /мл культивировали 24 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением конканавалина А (в конечной концентрации 5 мкг/мл). В культуральной жидкости спленоцитов, методом ИФА (тест-системы фирмы "BioSource International", США, "Bender Medsystems", Австрия) определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ)-4, ИЛ-6, интерферона- γ (ИНФ- γ), фактора некроза опухолей α (ФНО- α).

В сыворотке крови методом ИФА проводили определение уровня общего и свободного тестостерона, с использованием коммерческих наборов ("Adaltis", Италия).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программах Statistica 7.0, Microsoft Excel с использованием параметрических и непараметрических методов. Статистически значимыми различия считали при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе животных, которым вводили гомогенат добавочных желез с адьювантом Фрейнда, уровни общего и свободного тестостерона снижались, но достоверных различий по сравнению с показателями контрольной группы не было (табл.1).

Таблица 1

Показатели уровня общего и свободного тестостерона в сыворотке крови крыс Вистар контрольной и опытных групп ($M \pm SD$)

Группа наблюдений	Уровень тестостерона в сыворотке крови крыс	
	Общий (нг/мл)	Свободный (пг/мл)
Контрольная	0,72±0,27 (1)*	2,37±0,74 (3)
Хронический простатит	0,61±0,15 (2)	2,01±0,38 (4)
Достоверность различий	$p_{1-2}=0,088361$	$p_{3-4}=0,456057$

Условные обозначения: *- номер группы наблюдений

При морфологическом исследовании предстательной железы крыс, которым вводили гомогенат добавочных желез с адьювантом Фрейнда, выявлялась картина хронического простатита, характеризовавшаяся сочетанием дистрофических, дескваматозных и пролиферативных изменений эпителия ацинусов, расширением их просвета, диффузно-очаговой инфильтрацией из лимфоцитов, гистиоцитов, тучных клеток, очаговым склерозом внутридольковой стромы (рис. 1).

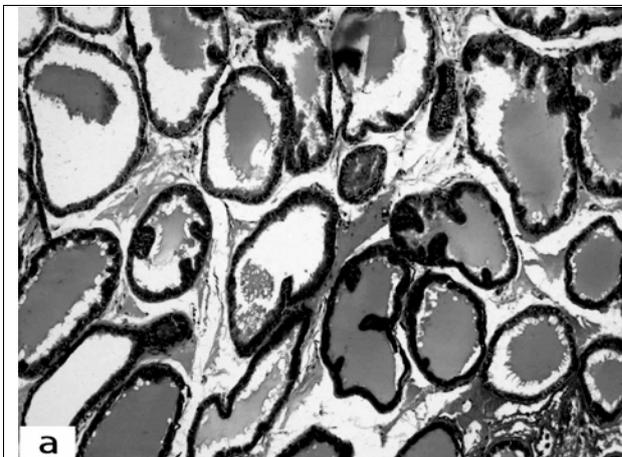


Рис. 1 а. Морфологические изменения предстательной железы крыс Вистар при хроническом простатите: контрольная группа. Большая часть ацинусов заполнена секретом, эпителиальная выстилка не нарушена, внутридольковая строма рыхлая; окраска гематоксилином и эозином, X 100

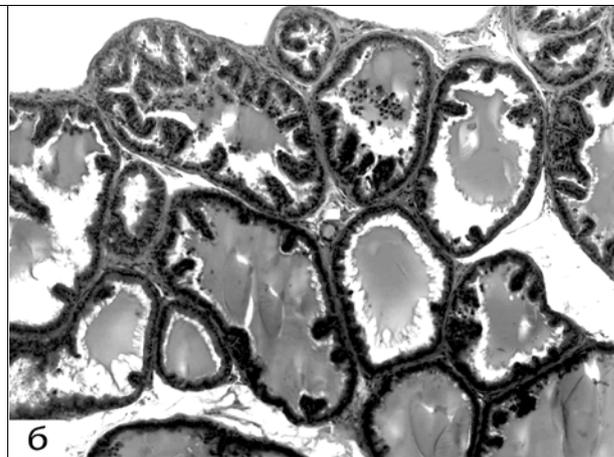


Рис. 1 б. Морфологические изменения предстательной железы крыс Вистар при хроническом простатите: просветы ацинусов расширены, в них десквамированный эпителий; окраска гематоксилином и эозином, X 100

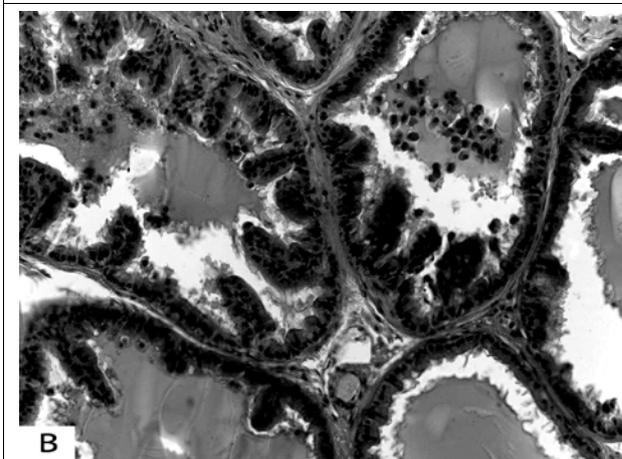


Рис.1 в. Морфологические изменения предстательной железы крыс Вистар при хроническом простатите: эпителий высокий, пролиферирующий с образованием сосочкоподобных выростов, выражена десквамация эпителия; окраска гематоксилином и эозином, X 200

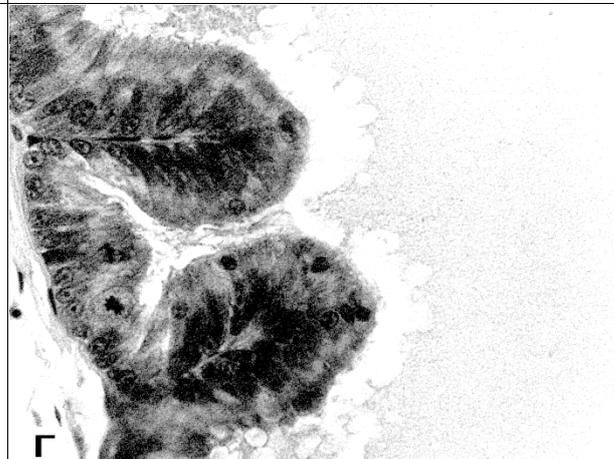


Рис.1 г. Морфологические изменения предстательной железы крыс Вистар при хроническом простатите: эпителий ацинусов высокий, пролиферирующий, с нарушением рядности ядер, митоз; окраска гематоксилином и эозином, X 640

По данным морфометрического исследования показатели объемной доли ацинусов, эпителия и стромы, в предстательной железе крыс контрольной и опытной групп статистически значимо не изменялись (табл. 2)

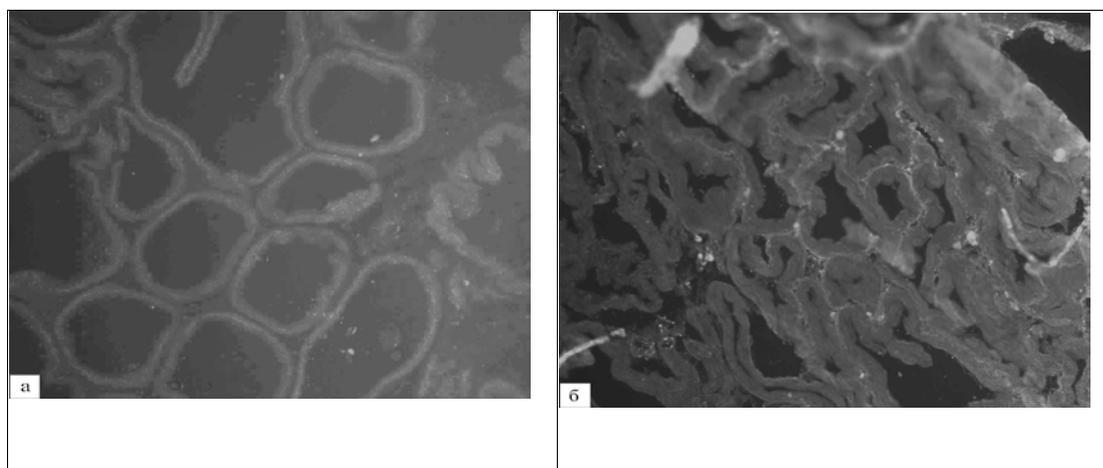
Морфометрическая характеристика структурных изменений предстательной железы крыс Вистар контрольной и опытной групп

Показатели объемной доли в %	Группы наблюдений		Достоверность различий
	Контрольная группа	Хронический простатит	
Ацинусы	66,85±1,69 (1)	63,81±2,51 (2)	$p_{1-2}=0,601732$
Строма	33,51±1,69 (3)	36,12±2,51 (4)	$p_{3-4}=0,655489$
Эпителий	30,74±1,87 (5)	26,29±2,05 (6)	$p_{5-6}=0,159786$
Ацинусы с секретом	20,77±3,36 (7)	26,09±2,88 (8)	$p_{7-8}=0,225443$
Ацинусы без секрета	13,25±2,97 (9)	21,52±2,52 (10)	$p_{9-10}=0,009999$
Десквамация эпителия	8,64±1,54 (11)	28,71±6,85 (12)	$p_{11-12}=0,017978$
Клеточный инфильтрат	2,48±0,54 (13)	4,17±0,77 (14)	$p_{13-14}=0,007620$
Число тучных клеток	8,95±0,90 (15)	9,58±0,62 (16)	$p_{15-16}=0,273822$
Индекс дегрануляции	1,75±0,13 (17)	1,79±0,08 (18)	$p_{17-18}=0,742557$

При хроническом простатите отмечалось повышение показателей объемной доли ацинусов без секрета, десквамации ацинарного эпителия и увеличение объемной доли воспалительного инфильтрата во внутридольковой строме. Количество тучных клеток, а также индекс их дегрануляции в сравниваемых группах достоверно не различались.

Таким образом, по данным морфологического и морфометрического исследования у крыс Вистар при введении гомогената добавочных желез с адьювантом Фрейнда, развивался хронический простатит, который характеризовался усилением пролиферативных и десквамативных изменений эпителия ацинусов предстательной железы, очаговым фиброзом внутридольковой стромы, воспалительной инфильтрацией.

При иммунофлюоресцентном исследовании обнаружена очаговая фиксация IgG в базальной пластинке эпителия ацинусов при обработке неизменной предстательной железы сывороткой крови крыс с хроническим простатитом. При обработке срезов предстательной железы сывороткой крови интактных крыс свечение отсутствовало (рис.2).



<p>Рис.2 а. Иммунофлюоресцентное исследование криостатных срезов предстательной железы интактных крыс: сыворотка крови (1:400) и меченные ФИТЦ антитела против IgG крысы; X 200</p>	<p>Рис.2 б.Иммунофлюоресцентное исследование криостатных срезов предстательной железы интактных крыс: сыворотка крови крыс с хроническим простатитом (1:400) и меченные ФИТЦ антитела против IgG крысы; X 200.</p>
---	--

В криостатных срезах печени свечение отсутствовало, как при использовании сыворотки крови крыс контрольной группы, так и крыс с хроническим простатитом.

В группе крыс с хроническим простатитом выявлено достоверное снижение показателей уровня продукции спленоцитами ИЛ-4 ($p=0,016$), ФНО- α ($p=0,002$) и тенденция к снижению ИНФ- γ ($p=0,086$) (рис.3).

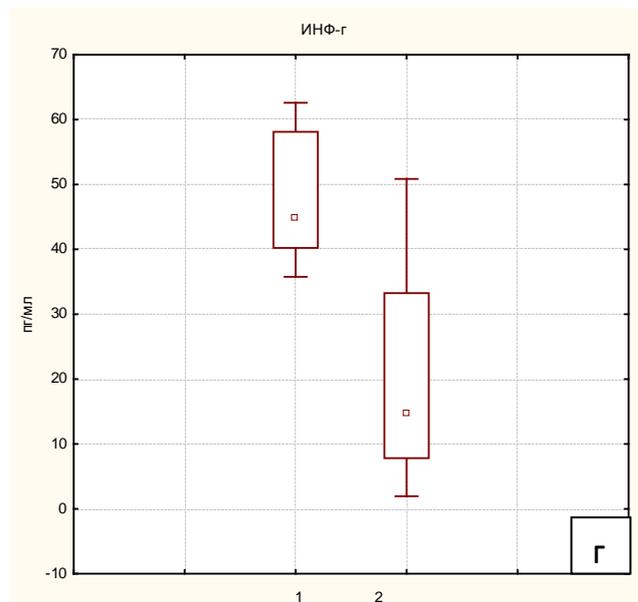
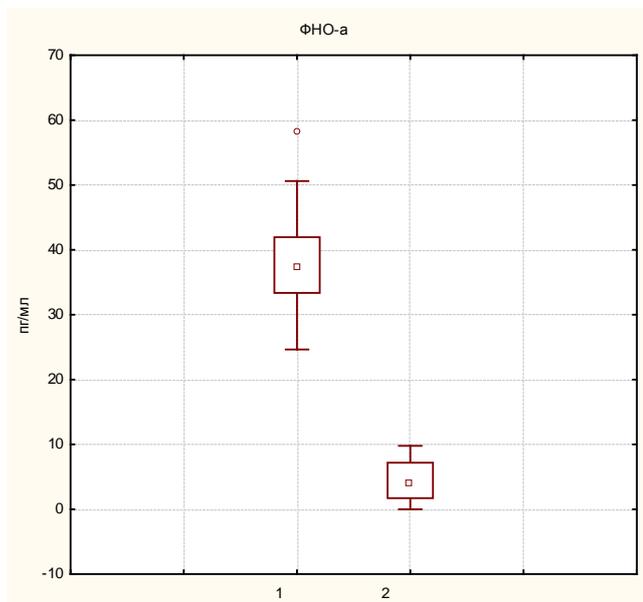
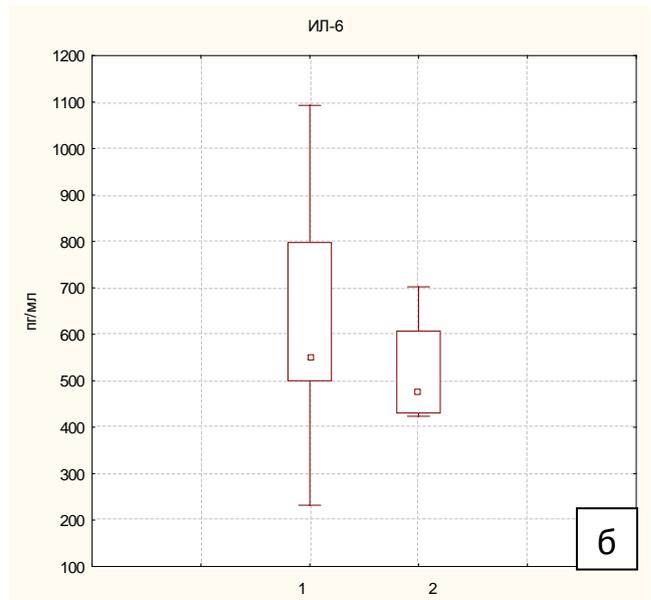
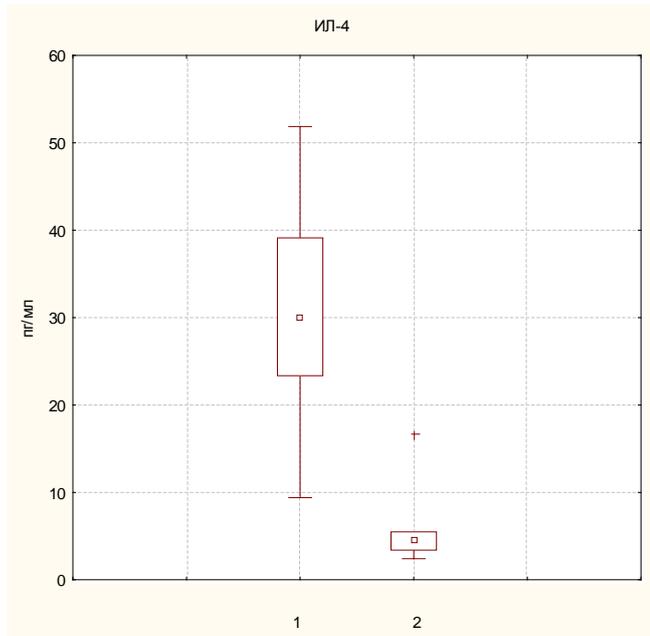


Рисунок 3. Изменения уровня продукции цитокинов спленocyтaми крыс Вистар контрольной группы и при хроническом простатите

Группы наблюдений:

- 1- Контрольная*
- 2- Хронический простатит*
- а- ИЛ-4, б-ИЛ-6, в- ФНО-а, г- ИНФ-γ*

Показатель уровня ИЛ-6 ($p=0,46$) достоверно не изменялся.

Полученные нами данные о снижении уровня продукции ФНО- α и отсутствии изменений уровня ИЛ-6 согласуются с результатами исследований Q.Y.Zhang и соавт.(2010), которые выявили аналогичные изменения на модели хронического абактериального простатита у крыс Спрейг-Доули[9]. Снижение уровня цитокинов, по-видимому, обусловлено преимущественной пролиферацией аутореактивного клона Т-лимфоцитов и нарушениями реакций врожденного и адаптивного иммунитета.

Таким образом, введение гомогената добавочных половых желез с адьювантом Фрейнда крысам Вистар вызывает развитие хронического аутоиммунного простатита, который, по данным морфологического и морфометрического исследования, характеризуется дистрофическими, десквамативными и пролиферативными изменениями эпителия, диффузно-очаговой воспалительной инфильтрацией и очаговым фиброзом стромы. Развитие аутоиммунного простатита обусловлено нарушениями центральных и периферических механизмов толерантности, которые индуцируют введение гомогената добавочных половых желез с адьювантом Фрейнда. Нарушение механизмов толерантности связано с аутоиммунным регуляторным геном (AutoImmune regulator AIRE), который экспрессируется ретикулоэпителиальными клетками мозгового слоя тимуса и антигенпрезентирующими клетками периферических лимфоидных органов [2]. В эксперименте показано, что AIRE-зависимыми антигенами при экспериментальном хроническом аутоиммунном простатите являются секреторный протеин-2 семенных пузырьков, простатический стероидсвязывающий белок. AIRE- играет ключевую роль в негативной селекции аутореактивных тимоцитов и этот процесс нарушается в отсутствие AIRE. AIRE регулирует эктопическую транскрипцию периферических тканевых антигенов, таким образом, он контролирует центральную толерантность к аутоантигенам, вызывая негативную селекцию аутореактивных Т-клеток, что характеризуется воспалительными инфильтратами в органах и продукцией аутоантител. При иммунофлюоресцентном исследовании нами показано, что в сыворотке крови крыс Вистар с хроническим аутоиммунным простатитом выявляются аутоантитела класса IgG, которые очагово связывались с базальной пластинкой ацинусов.

Механизмы развития хронического простатита вызванного введением гомогената добавочных половых желез с адьювантом Фрейнда, связаны с нарушениями толерантности к простатическим антигенам, и недостаточностью транскрипционного фактора AIRE [6]. В эксперименте показано, что при адаптивном переносе спленоцитов крыс с аутоиммунным хроническим простатитом в предстательной железе у животных-реципиентов, развивается картина, характерная для аутоиммунного простатита [4].

В модели аутоиммунного хронического простатита основным аутоантигеном по данным Ноу Y. (2009) является простатический стероид-связывающий белок [8]. Этот белок является главным секреторным белком, вентральной простаты крыс, и способен индуцировать как клеточный, так и гуморальный аутоиммунный ответ.

Выводы

1. При введении гомогената добавочных половых желез с адьювантом Фрейнда у крыс Вистар развивается хронический аутоиммунный простатит, который морфологически характеризуется дистрофическими, десквамативными и пролиферативными изменениями эпителия, диффузно-очаговой воспалительной инфильтрацией и очаговым фиброзом стромы.
2. При иммунофлюоресцентном исследовании обнаружена очаговая фиксация IgG в базальной пластинке эпителия ацинусов при обработке неизменной предстательной железы сывороткой крови крыс с хроническим простатитом.
3. При экспериментальном аутоиммунном хроническом простатите, у крыс Вистар достоверно снижается продукция спленоцитами ИЛ-4, ФНО- α , а уровень ИНФ- γ , ИЛ-6 не изменяется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Урология. Национальное руководство /Н.А. Лопаткин [и др.]; под ред. Н.А. Лопаткина.- М.ГЭОТАР-Медицина, 2009. -538с
2. Mathis D., Benoist C., A decade of AIRE. Nat.Rev.Immunol. 2007 7: P.645-650
3. Motrich R.D., Macconi M., Riera C.M., Rivero V.E., Autoimmune prostatitis: State of the Art. Scand J Immunol.2007 Aug-Sep;66 (2-3) P. 217-227
4. Orsilles M.A., Depiante-Depaoli M. Oxidative stress-related parameters in prostate of rats with experimental autoimmune prostatitis. The Prostate 1998 (34) P.270–274
5. Pacheco-Rupil B, Depiante-Depaoli M, Casadio B. Experimental autoimmune damage to rat male accessory glands. II. T cell requirement in adoptive transfer of specific tissue damage. Am J Reprod Immunol. 1984 Jan-Feb;5(1):15-9.
6. Rizzi M., Ferrera F., Filaci G., Indiveri F., Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. Autoimmun Rev. 2006 Feb;5(2):P.145-147
7. Xiao-hui Zhou, Lian-da Li, Li-mao Wu, Increased inflammatory Factors Activity in model rat with experimental autoimmune prostatitis. Arch. of Androl 2007 P.49-52
8. Hou Y., DeVoss J., Dao V., Kwek S., Simko J.P., Douglas G., Fong An aberrant prostate antigen–specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans. J Clin Invest. 2009 July 1; 119(7): P.2031–2041
9. Zhang Q.Y., Mo Z.N., Liu X.D., Reducing effect of curcumin on expressions of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 in rats with chronic nonbacterial prostatitis. Nat.J.of Androl. 2010 16(1):P.84-88

IMMUNOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS EXPERIMENTAL CHRONIC AUTOIMMUNE PROSTATITIS

I.S .Tsvetkov, V.A. Mkhitarov

In experiments on Wistar rats was reproduced by a model of chronic autoimmune prostatitis introduction homogenate additional sexual glands of rats. For morphometrical and morphological study of histological slides of the prostate were identified degenerative and proliferative epithelial changes acini, inflammatory infiltration, focal fibrosis. For immunofluorescence study revealed deposits of IgG in the basal plate epithelial acini processing sections of prostate serum of rats with chronic prostatitis. In the culture fluid of splenocytes was reduced levels of IL-4, TNF- α .

Key words: chronic autoimmune prostatitis, an experimental model, morphology, cytokines

Мхитаров В.А. – старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления УРАМН НИИ морфологии человека РАМН, к.б.н.; mortolhum@mail.ru

Цветков И.С. – аспирант лаборатории иммуноморфологии воспаления УРАМН НИИ морфологии человека РАМН, к.б.н.; mortolhum@mail.ru