

Влияние глюкокортикоидной терапии на морфофункциональное состояние яичников при экспериментальном аутоиммунном оофорите

Тупицына Т.В., Тихоновская О.А., Невоструев С.А., Дмитриева М.Л., Логвинов С.В.

Effect of glucocorticoid treatment on ovarian morphology and function in experimental autoimmune oophoritis

Tupitsyna T.V., Tikhonovskaya O.A., Nevostruyev S.A., Dmitrieva M.L., Logvinov S.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Тупицына Т.В., Тихоновская О.А., Невоструев С.А. и др.

На экспериментальной модели аутоиммунного оофорита проведено изучение влияния глюкокортикоидов на характер и динамику изменений различных тканевых элементов яичников с использованием гистологических и гистохимических методик, определено содержание антиовариальных антител (АОА) в сыворотке крови экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа. Установлено недостаточно эффективное действие глюкокортикоидной терапии по непосредственным и отдаленным результатам. Динамическое снижение АОА, нормализация удельных объемов генеративных элементов сопровождаются усиленными атретическими процессами, большинство генеративных структур остаются деструктивно измененными.

Ключевые слова: аутоиммунный оофорит, глюкокортикоидная терапия, антиовариальные антитела, морфология.

The effect of glucocorticoids (GC) on the character and dynamics of changes in various tissue elements of the ovaries were studied in an experimental model of autoimmune oophoritis using histological and histochemical techniques. The content of antiovarian antibodies (AOA) was determined in the serum of experimental animals by enzyme immunoassay. Not enough effective action of GC therapy was found on the immediate and long-term results. Dynamic decrease of AOA and normalization of the specific volumes of the generative elements were accompanied by increased follicular atresia. Most of the generative structures were destructively modified.

Key words: autoimmune oophoritis, glucocorticoid therapy, antiovarian antibodies, morphology.

УДК 618.11-002:612.017.12]-085:615.256.5

Введение

Аутоиммунный оофорит (АО) является одним из факторов развития различных форм аменорей [1, 2, 4, 5, 7, 8]. Поражение гонад аутоиммунной природы в 43—69% случаев приводит к формированию гипергонадотропной аменореи [1, 5, 8], а при нормогонадотропной форме у 19,2—31,5% женщин выявляются морфологические признаки АО и антиовариальные антитела (АОА) [2, 5]. Вопрос о целесообразности

глюкокортикоидной терапии (ГКТ) при АО остается дискуссионным, ее клиническая эффективность обсуждается многими авторами [1, 6], тем не менее проблема остается открытой и нуждается в дальнейшем изучении, в том числе на экспериментальном уровне. На кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) (г. Томск) создана оригинальная модель аутоиммунного воспаления яичников и установлены сроки формирования патологического процесса (30-

е сут эксперимента) по характерным морфологическим критериям, а также высокой концентрации АОА в сыворотке крови.

Цель исследования — определить влияние ГК на характер, динамику и последовательность изменений различных тканевых элементов яичников крыс при экспериментальном АО.

Материал и методы

Эксперимент проведен на беспородных белых половозрелых крысах-самках. Проведение эксперимента регламентировано разрешением этического комитета СибГМУ № 1928 от 28.03.2011 г.

Основной группе животных (12 крыс) с целью создания АО проводилась иммунизация дополнительно очищенным трехкратным замораживанием антигеном, представляющим собой экстракт яичников интактных животных. Антиген вводили внутривентриально пятьюкратно через день в фазах покоя эстрального цикла (№ 2439712 от 10.01.2012 г.). На 30-е сут после окончания моделирования АО крысам вводили преднизолон («Никомед», Австрия) в дозе 3 мг/кг массы тела внутримышечно 14-дневным курсом.

Группой сравнения (12 крыс) служили животные с данной моделью без курса ГКТ. Контроль — интактные крысы (6 животных).

Длительность эксперимента составила 60 сут. Взятие материала осуществляли на 45-е и 60-е сут после последнего введения антигена. Животных выводили из эксперимента в фазу диэструса (кольпцитологический контроль) декапитацией под эфирным наркозом в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и Федеральным законом РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Для гистологического исследования яичники фиксировали в 12%-м нейтральном формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону, толуидиновым синим, проводили гистохимическое исследование (по Браше, ШИК-реакция). Определяли концентрацию антивариабельных антител (нг/мл) методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ООО «ДиаГомПлюс», г. Томск). Для количественной оценки морфологических изменений в яичниках проводили морфометрию в соответ-

ствии с руководством Г.Г. Автандилова (1990). Подсчет первичных, вторичных и третичных фолликулов, атретических фолликулов и тел, желтых тел, сосудов выполняли на серийных срезах через каждые 150—200 мкм с использованием окулярной измерительной сетки, представляющей большой квадрат, содержащий 25 точек. Удельный объем определяли согласно фундаментальному принципу стереологии Кавальери—Акера—Глаголева.

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Анализ полученных данных осуществляли методами описательной статистики с вычислением медианы Me и интерквартильного размаха ($Q_1—Q_3$). Сравнение средних значений двух выборок выполняли непараметрическим методом (U -тест Манна—Уитни) при распределении значений, отличном от нормального. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При аутопсии у крыс основной группы обнаруживается умеренно выраженная гиперемия яичников, их размеры составляют 5—6 мм и не отличаются от таковых в контрольной группе. Размеры гонад в группе сравнения достигают 3—4 мм, половые железы полнокровны с явлениями застойной гиперемии.

К 45-м сут опыта в гонадах животных с моделью АО без ГКТ наблюдается выраженное повреждение генеративного аппарата. Фолликулярный эпителий подвержен десквамации и дископлексации, овоциты, как правило, разрушены, ядро не определяется. Вблизи вторичных и третичных фолликулов визуализируются лимфоциты, которые проникают в наружную и внутреннюю теку, единичные мононуклеары локализуются в гранулезном слое. Третичные фолликулы претерпевают наиболее сильные деструктивные изменения. Текальная оболочка (наружная и внутренняя) часто утолщена, в переплетениях коллагеновых волокон видны фибробласты и лимфоциты. Встречаются фолликулы на стадии граафова пузырька, у которых слой фолликулярного эпителия теряет связь с базальной мембраной, одновременно приобретает складчатость в этой области и слущивается единым пластом в полость фолликула. Стенка данных структур, как правило, истончена и представлена фиброзной тканью. В окружении вторичных фолликулов явления разрастания соединительной ткани выражены в меньшей

степени. Первичные фолликулы встречаются крайне редко, клетки двухслойной гранулезы разобщены, с явлениями дистрофии. Примордиальные фолликулы, расположенные в аваскулярных зонах, остаются интактными. Желтые тела нередко инфильтрированы лимфоцитами, в центре многих определяется соединительнотканый рубец, встречаются генеративные элементы с массивными кровоизлияниями в лютеиновую ткань. На данных сроках опыта выявлены лютеиновые кисты. Основная масса клеточных элементов кист желтых тел (КЖТ) представлена лютеоцитами. Тека лютеиновые клетки располагаются снаружи от лютеинового пласта и не имеют четкой границы с подлежащей соединительной тканью. Внутренняя поверхность кист выстлана уплощенным эпителием. Встречаются также кисты, природу которых установить не представляется возможным ввиду атрофии клеток гранулезы и теки. Их стенка образована фиброзной капсулой, внутреннее содержимое — оксифильная масса, нередко с примесью эритроцитов. К 45-м сут в сосудах венозного типа отмечается умеренно выраженное застойное полнокровие, чаще обнаруживаются явления периваскулярного склероза. В артериях наблюдается пролиферация эндотелия. Интерстициальная ткань мозгового вещества инфильтрирована лимфоцитами, встречаются участки разрастания соединительной ткани.

Концентрация АОА составляет 10,3 (5,5—10,3) нг/мл, что достоверно отличается от интактного контроля: 2,67 (1,18—4,2) нг/мл; $p = 0,0021$.

К 60-м сут экспериментального АО выявлена картина тотального повреждения растущих фолликулов (дискомплексации и десквамации фолликулярного эпителия, деструкции овоцита). Инфильтраты, представленные лимфоцитами и моноцитами, окружают первичные и вторичные фолликулы. В наружном и внутреннем слоях теки, в мозговом веществе, а также периваскулярно отмечаются явления фиброзирования соединительной ткани. В сосудах сохраняется стаз форменных элементов крови.

Содержание АОА — 14,06 (12,23—22,77) нг/мл ($p = 0,0006$ к контрольной группе).

Морфоколичественный анализ, проведенный на 45-е сут в группе сравнения, демонстрирует снижение удельного объема первичных (I) и третичных (III) фолликулов по сравнению с показателями интактных крыс ($Me (Q_1—Q_3)$: I — до 0,02 (0,02—0,24)%; III —

до 4,72 (1,94—7,76)%; ($p = 0,036$ и $0,005$ соответственно)), в то время как удельный объем вторичных фолликулов составляет 5,41 (2,50—7,30)% и не отличается от значений контрольной группы ($p = 0,816$). К 60-м сут удельный объем растущих фолликулов увеличивается до 12,45 (8,87—14,57)% ($p = 0,046$ к группе контроля), третичные фолликулы не обнаруживаются. На фоне высоких значений удельных объемов сосудов и снижения желтых тел продолжают сохраняться повышенные показатели атретических фолликулов и тел. К 45-м сут их удельный объем составляет 18,49 (15,59—20,45)%; на 60-е сут — 3,35 (2,43—6,16)%; в контроле — 1,37 (0,45—2,16)%; $p = 0,001$ и $p = 0,027$, соответственно. На 45-е сут экспериментального АО происходит формирование кист, к этому времени их удельный объем достигает максимума — 18,41 (0,76—18,73)%, к 60-м сут уменьшается до 12,50 (8,50—12,5)% ($p = 0,002$ к группе контроля).

Проведение ГКТ модифицирует морфофункциональное состояние яичников при аутоиммунном воспалении. К 45-м сут в группе крыс, получавших лечение преднизолоном, генеративный аппарат половых желез характеризуется менее выраженными патологическими изменениями. Некоторые вторичные фолликулы содержат овоцит, в котором визуализируется ядро с ядрышком. Клетки гранулезы имеют обычное строение, тека инфильтрирована небольшим количеством мононуклеарных лейкоцитов. Вокруг фолликулов, в периваскулярных зонах и мозговом веществе наблюдается слабо выраженное разрастание соединительной ткани. Этот эффект, вероятно, реализуется вследствие способности преднизолона к подавлению активности фибробластов [3]. Большинство желтых тел имеют обычное строение, иногда встречаются лютеиновые тела с признаками нарушения кровообращения. Со стороны микроциркуляторного русла отмечается ослабление застойных процессов. Сосуды артериального русла более полнокровны, склеротические изменения — встречаются реже. По-прежнему присутствуют КЖТ, однако их количество меньше, чем в группе сравнения. Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что регресс патоморфологических изменений носит частичный характер, и значительное число генеративных структур остаются деструктивно измененными.

Содержание АОА на 45-е сут после ГКТ составило 4,6 (4,5—5,3) нг/мл, что достоверно выше

($p = 0,007$), чем у крыс контрольной группы, однако значительно ниже ($p = 0,028$), чем у животных группы сравнения (45-е сут).

С целью изучения последствий ГКТ проведен забор материала через 14 сут после окончания введения преднизолона (60-е сут). В эти сроки эксперимента в яичниках животных основной группы выявлен ряд особенностей. Так, обращает на себя внимание сохранение, а в некоторых случаях нарастание лимфоцитарной инфильтрации в окружении фолликулярного аппарата, особенно в области третичных фолликулов, меньшее — в текальной оболочке вторичных фолликулов. У части первичных фолликулов овоцит разрушен, в их окружении, как правило, визуализируются мононуклеарные лейкоциты. Кроме того, увеличивается частота и степень деструктивных изменений овоцитов и клеток гранулезы, неизменные генеративные элементы практически не встречаются (кроме примордиальных фолликулов) и представлены в основном первичными фолликулами. Наблюдается усиление гемодинамических нарушений в медуллярной зоне яичников. Сосуды венозного типа становятся более полнокровными, местами в венах определяется тромбоз и миграция лейкоцитов в интерстиций. Одновременно встречаются участки мозгового вещества с запусевающим сосудистым руслом. С прежней частотой (как на 45-е сут в основной группе) выявляются КЖТ и кровоизлияния в желтые тела. Разрастание соединительной ткани к 60-м сут эксперимента слабо выражено либо полностью отсутствует.

К 60-м сут в основной группе животных концентрация АОА составила 3,3 (3,0—3,6) нг/мл, что достоверно ниже, чем у животных группы сравнения ($p = 0,004$) и не отличается от интактного контроля ($p = 0,96$).

Морфометрические исследования свидетельствуют о нормализации удельных объемов некоторых генеративных элементов в основной группе животных. Сразу после окончания ГК терапии (45-е сутки) удельный объем растущих фолликулов составляет — 9,73 (6,10—11,74)%, в отдаленные сроки (60-е сут) — 7,79 (5,41—10,26)%, что достоверно отличается от значений группы сравнения ($p = 0,049$ и $p = 0,035$, соответственно) и не отличается от интактного контроля ($p = 0,462$ и $p = 0,599$). Аналогичная ситуация складывается в отношении третичных фолликулов: на 45-е

сутки их удельный объем равен 11,08 (7,9—18,17)%, на 60-е — 8,02 (3,68—14,03)% ($p = 0,013$ и $p = 0,0003$ к группе сравнения; $p = 0,752$ и $p = 0,528$ к группе контроля). Удельный объем желтых тел достигает 28,78 (25,25—56,15)% на 45-е сут ($p = 0,2$ по отношению к интактным крысам) и не отличается от такового в группе контроля к 60-м сут (48,36 (43,95—56,0)%; $p = 1,0$). Определенная положительная динамика прослеживается в отношении количественного содержания ретенционных образований. Как на 45-е, так и на 60-е сут в основной группе животных выявлено уменьшение удельного объема кист: 4,02 (3,80—11,27)% и 3,47 (0,24—12,83)% соответственно, однако в контрольной группе эти элементы не встречаются. Данные морфоколичественного анализа в отношении атретических структур, а также удельного объема сосудов характеризуются повышенными значениями. Удельный объем атретических фолликулов и тел достигает 12,85 (7,5—15,7)% непосредственно после окончания ГКТ и 10,39 (5,38—14,64)% в поздние сроки эксперимента ($p = 0,0007$ и $p = 0,003$ соответственно к группе контроля; к группе сравнения: на 45-е сут $p = 0,037$, на 60-е сут $p = 0,089$). Удельный объем сосудов достоверно выше показателей интактных животных в различные сроки эксперимента.

Несмотря на динамическое снижение АОА, нормализацию удельных объемов первичных, вторичных и третичных фолликулов, желтых тел, гистологическое строение перечисленных структур характеризуется определенными патоморфологическими изменениями: овоциты разрушены, клетки гранулезы подвержены десквамации и дисконфлексации. Следует отметить, что данные явления затрагивают преимущественно третичные фолликулы. Кроме того, сохраняются гемодинамические нарушения в медуллярной зоне, по-прежнему усилены атретические процессы, выявлены ретенционные образования. Недостаточная эффективность глюкокортикоидной терапии сразу после ее окончания (45-е сут опыта), а также в поздние сроки (60-е сут) может быть связан с продолжающимся фолликулогенезом и формированием третичных генеративных элементов, которые поддерживают аутоиммунные процессы в яичнике. Возможно, сочетание глюкокортикоидов с препаратами, способными тормозить рост доминантного фолликула и, следовательно, уменьшать аутоантигенную нагрузку окажет более выраженный терапевтический эффект. Данное

предположение имеет важное прикладное значение и нуждается в дальнейшем изучении.

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о краткосрочности и недостаточной эффективности ГК терапии при экспериментальном АО по непосредственным и отдаленным результатам.

Литература

1. Айламазян Э.К., Габелова К.А., Гзззян А.М., Потин В.В. Аутоиммунный оофорит (патогенез, диагностика, перспективы лечения) // Акушерство и гинекология. 2002. № 2. С. 7.
2. Гзззян А.М. Роль аутоиммунного оофорита в развитии гипергонадотропной и нормогонадотропной недостаточности яичников: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1995. 40 с.
3. Драник Г.Н., Гриневич Ю.А., Дизик Г.М. Иммунотропные препараты. Киев, 1994. С.151—173.
4. Потин В.В., Смагина Е. Е., Гзззян А. М. и др. Патогенез и диагностика аутоиммунного оофорита // Журн. акушерства и женских болезней. 2000. Т. 49, вып. 2. С. 59—66.
5. Смагина Е.Е. Роль аутоиммунных процессов в патогенезе нормогонадотропной недостаточности яичников: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб, 1996. 38 с.
6. Царегородцева М.В. Патогенетические основы формирования аутоиммунного оофорита при хронических воспалительных заболеваниях органов малого таза и его восстановительная терапия // Аг-инфо. 2007. № 2. С.32—36.
7. Damewood M.D., Zacur H.A., Hoffman G.J., Rock J.A. // Obstet. and Gynecol. 1986. V. 68, № 6. P. 850—854.
8. Luborsky J.L., Visintin I., Boyers S. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1990. V. 70, № 3. P. 69—75.

Поступила в редакцию 24.04.2012 г.

Утверждена к печати 30.05.2012 г.

Сведения об авторах

Т.В. Тупицына — аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

О.А. Тихоновская — д-р мед. наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии СибГМУ (г. Томск).

С.А. Невоструев — канд. мед. наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии СибГМУ (г. Томск).

М.Л. Дмитриева — аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

С.В. Логвинов — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Тупицына Татьяна Владимировна, тел. 8-923-403-6833; e-mail: tupicyna85@mail.ru

Уважаемые читатели!

Предлагаем вам подписаться на наш журнал с любого номера

В 2013 году стоимость подписки на полугодие составляет 1500 рублей, на год — 3000 рублей.

Как оформить подписку на журнал «Бюллетень сибирской медицины»

На почте во всех отделениях связи

Подписной индекс **46319** в каталоге агентства Роспечати «Газеты и журналы 2012, 2-е полугодие».

В редакции

• Без почтовых наценок.

• С любого месяца.

• Со своего рабочего места.

По телефону (382-2) 51-41-53; факс (382-2) 51-53-15.

На сайте <http://bulletin.tomsk.ru>

Если вы являетесь автором публикаций или хотите приобрести наш журнал, он будет выслан вам наложенным платежом при заполнении заявки. Стоимость приобретения одного номера 400 рублей.

Заявку на приобретение журнала нужно выслать по адресу редакции:

Тупицына Т.В., Тихоновская О.А., Невоструев С.А. и др. Влияние ГКТ на морфофункциональное состояние яичников...

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107,
Научно-медицинская библиотека Сибирского государственного медицинского университета,
редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины»,
тел. (8-3822) 51-41-53. E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru