

На правах рукописи

Тупицына Татьяна Владимировна

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ  
СОСТОЯНИЕ ЯИЧНИКОВ ПРИ АУТОИММУННОМ ООФОРИТЕ  
(экспериментальное исследование)

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология  
14.01.01- акушерство и гинекология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск - 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор Логвинов Сергей Валентинович  
доктор медицинских наук, профессор Тихоновская Ольга Анатольевна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор,  
профессор кафедры морфологии и общей  
патологии ГБОУ ВПО СибГМУ  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации

Плешко Раиса Ивановна

кандидат медицинских наук, научный  
сотрудник отделения патологии  
беременных ФГБУ НИИ акушерства,  
гинекологии и перинатологии  
СО РАМН

Малышева Ольга Геннадьевна

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Герасимов А.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Одной из актуальных проблем современной гистологии и практической медицины является изучение закономерностей морфологических изменений, механизмов адаптации и регенерации тканей репродуктивных органов при различных патологических состояниях, в том числе при аутоиммунном воспалении яичников [Царегородцева М.В., 2010; Брюхин Г.В., Ласьков Д.С., Сизоненко М.Л., 2013].

Альтерация герминативных и эндокринных элементов характерна для аутоиммунного поражения гонад и приводит к формированию вторичной овариальной недостаточности [Габелова К.А., Гзгзян А.М., Потин В.В. и соавт., 2010; Шамилова Н.Н., Марченко Л.А., Табеева Г.И., 2012; Carmina E., Campagna A.M., Mansuet P., 2012]. Тем не менее, клеточно-тканевые механизмы, приводящие к повреждению овосоматических гистионов при развитии аутоиммунного оофорита, остаются не изученными и ограничивают разработку эффективных мероприятий по его коррекции.

В настоящее время в клинической практике для лечения аутоиммунного оофорита используют различные методы, комбинируя препараты, обратимо подавляющие фолликулогенез (комбинированные оральные контрацептивы, агонисты гонадотропин-рилизинг гормона), иммуномодуляторы, нестероидные противовоспалительные и физиотерапевтические средства. Нередко подобные схемы включают препараты глюкокортикостероидов (преднизолон, дексаметазон).

Преднизолон относится к числу наиболее часто упоминаемых в литературе представителей данной группы и является синтетическим аналогом гормонов коры надпочечников (кортизона, гидрокортизона). Относительно низкая способность преднизолона к подавлению выработки АКТГ (до 24-36 часов) и минералокортикоидная активность обуславливают более редкую частоту возникновения побочных эффектов. Вместе с тем он оказывает выраженное противовоспалительное, иммунодепрессивное, антиаллергическое действие [Харкевич Д.А., 2010] и используется в терапии аутоиммунных заболеваний различной локализации [Мазуров В.И., 2001].

Целесообразность использования глюкокортикоидов при аутоиммунном оофорите, дозах и продолжительности лечения являются предметом дискуссий [Cohen J., Malter H., Elsner C. et al., 1990; Kalantaridou S.N., Braddock D.T., Patronas N.J. et al., 1999; Ubaldi F., Rienzi L., Ferrero S. et al., 2002; Welt C.K., 2008]. Результаты представленных клинических исследований (уровень доказательности 3-4), посвященные этой проблеме, зачастую противоречат друг другу [Габелова К.А., Гзгзян А.М., Потин В.В. и соавт., 2010; Царегородцева М.В., 2010; Kalantaridou S.N., Braddock D.T., Patronas N.J. et al., 1999], необходимые доклинические

испытания на лабораторных животных не проводились, несмотря на наличие современных моделей аутоиммунного оофорита.

Вышесказанное обуславливает необходимость изучения влияния глюкокортикоидной терапии на морфогенез экспериментального аутоиммунного оофорита. Изучение тканевых механизмов действия преднизолон, способность последнего предупреждать или подавлять патологические процессы, стимулировать репарацию клеточных элементов после перенесенного агрессивного воздействия имеют важное теоретическое и прикладное значение и остаются до настоящего времени не изученными.

**Цель исследования** - изучить влияние глюкокортикоидов на морфофункциональное состояние яичников с моделью аутоиммунного оофорита.

**Задачи исследования:**

1. Установить влияние преднизолон на характер, динамику и последовательность изменений структурно-функциональных элементов яичников на ранних этапах формирования экспериментального аутоиммунного оофорита.

2. Оценить влияние преднизолон на характер, динамику и последовательность изменений структурно-функциональных элементов яичников при сформировавшемся экспериментальном аутоиммунном оофорите.

3. Произвести серологическую оценку овариального резерва на основании определения концентрации ингибина В и антимюллерова гормона после коррекции аутоиммунного оофорита с использованием преднизолон.

4. Изучить морфофункциональное состояние яичников после курсового введения преднизолон интактным животным.

**Научная новизна.** Впервые в эксперименте изучено влияние преднизолон на морфофункциональное состояние яичников при аутоиммунном оофорите с использованием комплекса гистологических, гистохимических методик, а также с применением морфоколичественного анализа. Получены новые данные о характере и особенностях изменений тканевых элементов яичников под влиянием преднизолон в ранние и поздние сроки аутоиммунного воспаления половых желез. Установлено, что глюкокортикоидная терапия, начатая на 5-е сутки заболевания, уменьшает патоморфологические изменения в мозговом и корковом веществе яичников, способствует восстановлению адекватной гормональной функции половых желез, нормализует процессы роста и созревания фолликулов. При этом зафиксировано стойкое снижение иммунологической активности процесса, подтвержденное нормализацией концентрации антиовариальных антител в сыворотке крови опытных животных. Терапия глюкокортикоидами, проведенная в разгар заболевания

(30-е сутки), оказывает кратковременное и недостаточно эффективное терапевтическое воздействие, с возобновлением вяло текущего процесса в поздние сроки эксперимента. Снижение уровня антиовариальных антител до значений интактных крыс зафиксировано в поздние сроки эксперимента (60-е сутки).

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные экспериментальные данные расширяют знания о закономерностях влияния преднизолона на морфофункциональное состояние яичников при аутоиммунном оофорите, могут служить предпосылкой для разработки новых схем лечения аутоиммунного воспаления яичников с использованием глюкокортикоидов в среднетерапевтических дозах в клинической практике.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Глюкокортикоидная терапия, проведенная на ранних этапах формирования экспериментального аутоиммунного оофорита, снижает выраженность воспалительной реакции, нормализует морфологическое состояние половых желез, уменьшает атретические процессы и препятствует формированию вторичной недостаточности гонад.

2. Критериями недостаточной эффективности глюкокортикоидной терапии, проведенной в разгар экспериментального аутоиммунного оофорита, являются уменьшение числа структурно полноценных фолликулов, нарастающая перифолликулярная лимфоплазмочитарная инфильтрация и сниженный овариальный резерв.

**Внедрение.** Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ по теме «Женская репродуктивная система»; на кафедре акушерства и гинекологии лечебного факультета СибГМУ по теме «Воспалительные заболевания органов малого таза и бесплодие».

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 – в журналах, рекомендуемым Президиумом ВАК для опубликования основных результатов диссертаций.

**Апробация.** Материалы диссертации представлены на IV Международной научно-практической конференции «Интеллектуальный потенциал молодых ученых России и зарубежья» (Москва, 2012), IV научной конференции «Микроциркуляция в клинической практике» (Москва, 2012), XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012), Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов» (Оренбург, 2013), IV Всемирный конгресс по перинатальной медицине (Санкт-Петербург, 2013).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц, 2 фотографии, 35 микрофотографий, 18 электронограмм, 3 диаграммы. Диссертация состоит

из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и библиографического списка, включающего 199 литературных источников, из которых 73 на русском и 126 на иностранных языках.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперимент выполнен на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии (заведующий – д.м.н., профессор Логвинов С.В.), на базе лаборатории биологических моделей СибГМУ (заведующий – к.м.н., доцент Иванов В.В.). Проведение эксперимента регламентировано разрешением Этического комитета ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России № 1928 от 28.03.2011 г.

В качестве лабораторных животных использовали беспородных белых половозрелых крыс-самок массой 180-200 г. У животных данного вида закономерности протекания овариально-менструального цикла являются наиболее близкими к таковым у женщин, овуляция происходит спонтанно, а не индуцируется самцом [Лазарев Н.И., Ирд Е.А., Смирнова И.О., 1967].

Учитывая поставленные задачи, после окончания моделирования аутоиммунного оофорита (АО), а также в группе интактных крыс произведено введение глюкокортикостероида (ГКС) с последующим изучением морфофункционального состояния яичников, в периферической крови лабораторных животных исследована концентрация антиовариальных антител (АОА), антимюллеровского гормона (АМГ) и ингибина В.

В качестве модели аутоиммунного воспаления яичников был использован «Способ моделирования аутоиммунного оофорита» [патент № 2439712, Логвинов С.В., Тихоновская О.А., Невоструев С.А., Дмитриева М.Л.]. Моделирование аутоиммунного поражения гонад осуществляли путем введения овариального антигена, приготовленного из яичников интактных животных.

Эксперимент проводили в фазу покоя эстрального цикла (метаэструс, диэструс) для снижения толерантности животных к введению антигена [Пастухов М.И., 1970; Петрова М.С., 1999; Тихоновская О.А., 2000].

Способ приготовления экстракта из яичников осуществляли в следующей последовательности. Под действием ингаляционного наркоза (пары эфира) опытным животным производили декапитацию. Соблюдая условия стерильности, осуществляли нижнюю срединную лапаротомию с последующим извлечением яичников. Половые железы очищали от жировой ткани и помещали в физиологический раствор в стерильной пробирке. Для определения массы яичников, пробирку с физиологическим

раствором предварительно взвешивали. В условиях ламинара с помощью ножниц гонады тщательно измельчали, далее, используя стерильный гомогенизатор, ткани половых желез растирали до однородной массы, которую разводили физиологическим раствором и помещали в стерильную пробирку. Полученную суспензию трехкратно замораживали при температуре -18, -20 ° С, затем оттаивали до жидкой консистенции и центрифугировали в течение 15 минут (2500 об/мин.). Надосадочную жидкость фильтровали, полученную суспензию разводили физиологическим раствором из расчета 1 мл на 20 мкг ткани яичника. Иммунизацию проводили при помощи инсулинового шприца, интраперитонеально, в объеме 1 мл, пятикратно с интервалами между инъекциями в 1 день [Дмитриева М.Л., 2012].

После окончания моделирования аутоиммунного воспаления половых желез, животным производили инъекции ГКС [Хабриев Р.У., 2005]. Время их введения регламентировали ранее полученные данные о сроках формирования аутоиммунного оофорита, согласно которым на 5-е сутки заболевания обнаруживаются начальные морфологические изменения в виде появления единичных лейкоцитов в окружении сосудов мозгового вещества, к 30-м суткам выраженные гемодинамические нарушения ассоциируются с повреждением фолликулярного аппарата [Дмитриева М.Л., 2012].

Инъекции преднизолона (производитель - «Никомед», Австрия) производили внутримышечно, в область ягодиц, избегая повреждения нервных сплетений и кровеносных сосудов, в дозе 3мг/кг, ежедневно в течение 14 дней, до десяти часов утра [Заславская Р.М., 1989].

Всего проведено 5 серий опытов на 90 животных. Первая группа – контроль I, включавшая интактных животных (n=30) для изучения возрастных структурных изменений исследуемых органов. Вторая группа – контроль II, интактные животные, получавшие преднизолон (n=18) с целью изучения влияния ГКС на морфофункциональное состояние яичников по непосредственным (1-е сутки) и поздним (15-е и 40-е сутки) результатам. В третьей основной А группе (n=12) введение преднизолона осуществляли на ранних этапах формирования АО (5-е сутки) с выводом животных из эксперимента на 20-е и 60-е сутки моделирования АО. В четвертой основной Б группе (n=12) введение преднизолона производили при сформировавшемся АО (30-е сутки) с выводом животных из эксперимента на 45-е и 60-е сутки моделирования АО. Пятая - группа сравнения, включавшая животных с моделью АО (n=18), которые были выведены из эксперимента на 20-е, 45-е и 60-е сутки.

Вывод животных из эксперимента осуществляли с помощью декапитации под наркозом парами эфира в различные сроки опыта одновременно с группой интактного контроля. Эксперимент отвечал «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных

животных» Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и Федеральному Закону Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 21.03.2008г.

При аутопсии оценивали состояние органов брюшной полости: наличие и характер выпота, состояние брюшины, размеры яичников, характер структуры коркового вещества.

Объектом морфологического исследования являлись яичники. Фиксацию органов осуществляли в 12% нейтральном формалине и жидкости Карнуа, далее половые железы обезвоживали и заливали в парафин. Для приготовления срезов толщиной 5-7 мкм использовали санный микротом, депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону (выявление соединительной ткани), толуидиновым синим (идентификация тканевых базофилов). Гистохимически при окраске по Браше выявляли РНК; ШИК реакцией по Мак-Манусу выявляли гликоген и нейтральные гликопротеины. Для просмотра препаратов использовали микроскоп "Биолам ЛОМО". При помощи микроскопа "Аксиостар плюс" («Carl Zeiss», Германия) с блоком фотодокументирования (фотоаппарат Canon G10) получали цифровые микрофотографии, которые обрабатывали в графическом редакторе Axio Vision Rel. 4.8 («Carl Zeiss», Германия).

С целью объективизации полученных результатов и оценки функциональных изменений, происходящих в яичниках во всех точках эксперимента, было произведено морфометрическое исследование. Подсчет среднего содержания примордиальных, первичных, вторичных, третичных фолликулов, атретических фолликулов и тел, желтых тел производили на серийных срезах через каждые 150-200 мкм ткани яичников.

Удельный объем первичных, вторичных и третичных фолликулов, атретических фолликулов и тел, желтых тел, сосудов, интерстициальной ткани определяли с помощью окулярной измерительной сетки Г.Г. Автандилова (1990), состоящей из большого квадрата, содержащего 25 точек. Величина удельного объема представлена в процентах, так как за единицу объема было принято 100% [Гуцол А.А., Кондратьев Б.Ю., 1988].

Для электронной микроскопии материал, взятый из основной группы, группы сравнения и интактного контроля, фиксировали в 2,5% растворе глютаральдегида, приготовленном на основе 0,2 М какодилатного буфера (рН 7,2) по D.D. Sabatini, K. Bensch, R.G. Barnet (1963) при температуре 4°C, затем постфиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия на холоде в течение 4-х часов, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации с последующей заливкой в аралдит. На ультратоме "Ultrotom III" ("LKB", Швеция) готовили ультратонкие срезы. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, ультратонкие контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и



фотографирование изготовленных препаратов осуществляли с помощью электронного микроскопа “JEM-100 CXII” (“JEOL”, Япония).

Взятие крови для серологического исследования производили у животных основной группы, группы сравнения и интактного контроля, находящихся под действием ингаляционного наркоза, в положение на спине, перед декапитацией. После определения верхушечного толчка, используя шприц объемом 10 мл, производили внутрисердечный забор крови (5-8 мл). Для получения и хранения сыворотки пробирки с кровью центрифугировали и замораживали при температуре бытовой морозильной камеры (-20°C). Исследование концентрации АОА, ингибина В и АМГ производили в лаборатории ООО «ДиаТомПлюс», г. Томск, одновременно, при одинаковых условиях, с помощью иммуноферментного анализа, (Bioserv Diagnostics GmbH, Германия; Diagnostic system laboratories, Texas).

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакета программы Statistica® 6.0 (© StatSoft Inc.). Для анализа полученных данных использовали методы дескриптивной статистики. Проверку на соответствие выборок нормальному закону распределения проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Так как распределение значений не соответствовало нормальному, анализируемые данные указаны в виде медианы (Me), 25% и 75% квартилей (Q<sub>1</sub> и Q<sub>3</sub>, соответственно), для сравнения средних значений независимых выборок применен непараметрический метод (U-критерий Манна-Уитни). Различия считали достоверными (статистическими значимыми) при  $p < 0,05$ , если вероятность  $p > 0,05$ , показатели считали не обоснованными.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Морфология яичников интактных животных, получавших инъекции глюкокортикоидов**

При аутопсии во все сроки эксперимента размеры яичников интактных крыс составляют 0,5-0,6 см, корковое вещество не отличается от наблюдаемого у крыс первой контрольной группы, половые железы располагаются в брюшной полости свободно, сосудистое русло умеренно полнокровно, спаячный процесс не определяется.

Непосредственно после окончания введения преднизолонa (на 1-е сутки) в корковой зоне половых желез обнаруживается достаточное количество фолликулов различной степени зрелости, сохраняющих типичное гистологическое строение. Примордиальные фолликулы, расположенные по периферии коркового вещества под белочной оболочкой, характеризуются обычной структурной организацией, желтые

тела без патологических изменений, многие в стадии расцвета. Обращает на себя внимание усиление образования атретических фолликулов и тел. Гемодинамические нарушения не обнаруживаются, кровенаполнение сосудов умеренное, стенка артерий и вен не изменена. При окраске толуидиновым синим среди клеточных элементов соединительнотканной стромы выявляются единичные тканевые базофилы без признаков дегрануляции.

В поздние сроки (15-е и 40-е сутки) после окончания введения преднизолона морфологическое строение мозгового и коркового вещества сходно с описанным ранее, однако в корковом веществе наблюдается снижение образования атретических фолликулов и тел до показателей первой контрольной группы.

Таким образом, 2-х недельное введение преднизолона интактным животным не оказывает патологического воздействия на овоциты и другие структурно-тканевые компоненты половых желез. В 1-е сутки после окончания введения препарата выявлены несколько усиленные атретические процессы, в дальнейшем подобные изменения не обнаруживаются. Следовательно, препарат преднизолона, используемый по описанной выше схеме, не оказывает повреждающего действия на яичники и может быть использован для коррекции патологических состояний гонад, в том числе АО.

### **Морфологическая и ультраструктурная организация яичников после глюкокортикоидной терапии, проведенной на ранних этапах формирования аутоиммунного оофорита**

При вскрытии брюшной полости на 20-е сутки в некоторых случаях обнаруживаются увеличенные на 0,1-0,2 см яичники, тем не менее, большая часть половых желез имеет размеры 0,5-0,6 см. Кровенаполнение сосудистого русла придатков матки умеренное, спаечный процесс отсутствует. К 60-м суткам указанное состояние сосудистых элементов сохраняется. Яичники имеют обычные размеры и цвет, структура коркового вещества не отличается от таковой у интактных животных. Спайкообразование не определяется.

При световой микроскопии на 20-е сутки эксперимента после проведения курса ГСК терапии реакция генеративного аппарата яичников проявляется значительным увеличением количества желтых тел. Большинство из них имеет типичное гистологическое строение. Иногда встречаются лютеиновые тела с признаками нарушений гемодинамики в виде кровоизлияний в центральной части образования. Содержание первичных и вторичных фолликулов снижено, однако количество третичных фолликулов не различается с таковым из первой контрольной группы. Некоторые из указанных структур с дистрофическими проявлениями, заключающимися в снижении содержания гликогена в

овоцитах, обнаруживаются фолликулы с гомогенизированным ядерным материалом, деформированной блестящей оболочкой. Гранулезный слой данных фолликулов нередко дисконтактирован. Лимфоплазмодитарная инфильтрация в окружении генеративного аппарата и мозговом веществе яичников существенно снижена либо практически не определяется, что, вероятно, связано со способностью преднизолона ограничивать миграцию иммунокомпетентных клеток в очаг поражения [Харкевич Д.А., 2010]. Расширенные гемокапилляры и сосуды венозного типа, наблюдаемые в аналогичные сроки в корковом веществе у животных группы сравнения, обнаруживаются крайне редко. Неизменное морфологическое строение демонстрируют, главным образом, первичные фолликулы. Реже встречаются вторичные и третичные фолликулы, характеризующиеся обычным строением. Количество атретических тел и фолликулов повышено, однако существенно ниже, чем на 20-е сутки в группе животных с моделью АО без лечения. Содержание сосудов в мозговом веществе яичников не отличается от таковых в группе интактных крыс, они имеют, как правило, типичную структурную организацию и характеризуются умеренным кровенаполнением. Процессы экссудации отсутствуют, в связи с чем, клеточные элементы соединительнотканной стромы имеют типичное гистологическое строение. Тканевые базофилы встречаются в единичном количестве, как правило, без признаков дегрануляции.

На 60-е сутки опыта в корковой зоне яичников отмечается увеличение содержания растущих и зрелых фолликулов, имеющих, в большинстве своем, обычное строение. Количество желтых тел сохраняется на достаточно высоком уровне. Реже можно встретить фолликулы с патологическими изменениями овоцитов, структурными нарушениями блестящей оболочки и умеренно выраженной лимфоплазмодитарной инфильтрацией в их окружении. Описанные генеративные элементы представлены в основном вторичными и третичными фолликулами.

Гемодинамических нарушений, в отличие от наблюдаемых в группе сравнения (полнокровие сосудов, стаз и миграция форменных элементов), ни в корковом, ни в мозговом веществе половых желез выявить не удастся. Сосуды венозного и артериального типа, как правило, не изменены, содержание их в пределах нормы. Склеротические изменения в строме не определяются. Кое-где встречаются участки с пролиферирующими клетками фибробластического ряда, однако эти явления носят очаговый характер и не отражаются на ее объеме.

Во всех точках эксперимента усилены процессы образования атретических фолликулов и тел. Тканевые базофилы единичны, содержат умеренное количество метакроматической зернистости.

Описанные изменения могут быть связаны с выраженной противовоспалительной активностью препарата, в частности - со способностью преднизолона к стабилизации биологических мембран и благодаря его действию на тканевые базофилы [Марков И.И., Денисюк А.Б., 1974; Харкевич Д.А., 2010]. Известно, что в дебюте развития воспаления имеют место сосудистые расстройства, в результате которых происходит увеличение проницаемости эндотелиоцитов для компонентов жидкой части крови, в дальнейшем через возникшие дефекты начинают проникать иммунокомпетентные клетки. Преднизолон, благодаря стабилизации мембран, препятствует нарушению проницаемости сосудистой стенки и, таким образом, ограничивает проникновение мононуклеаров и плазмы в зону воспаления. При этом стабилизация стенок лизосом блокирует выход энзимов в окружающие ткани и, вероятно, уменьшает возникающие в них деструктивные процессы. Кроме того, ГК снижает синтез и секрецию гистамина тканевыми базофилами, что уменьшает проницаемость капилляров, обусловленную его высвобождением, и способствует сохранению структурной организации стенок кровеносных сосудов [Успенский М.В., Гриневич В.Б., Фокина А.А., 1981].

Данные электронно-микроскопического исследования сосудов мозгового вещества, начиная с 20-х суток, свидетельствуют об умеренной электронной плотности цитоплазмы эндотелиоцитов, содержащих невысокое содержание органелл и микровезикул, что, вероятно, говорит о восстановлении их ультраструктуры после проведенной терапии. В группе сравнения с моделью АО наблюдается низкая электронная плотность цитоплазмы эндотелиоцитов, митохондрии с просветленным матриксом и частичной деструкцией крист, цистерны эндоплазматической сети умеренно расширены, повышено содержание пузырьков и транспортных микровезикул.

К 60-м суткам в основной группе А ультраструктурная организация фолликулярного аппарата подтверждает отсутствие выраженных нарушений с его стороны. Цитоплазма эндокриноцитов теки и фолликулоцитов гранулезы характеризуется умеренным содержанием цистерн гладкой и гранулярной эндоплазматической сети, митохондрий и рибосом. В указанных структурах отмечено возрастание удельного объема осмиофильных гранул, являющихся свидетельством их восстановленного метаболизма и активизации стероидсинтетической функции. В группе сравнения в указанные сроки в аналогичных структурах обнаруживались изменения органелл в виде повышения электронной плотности митохондрий, расширения цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. При стереометрическом исследовании выявлено снижение удельного объема осмиофильных гранул.

Таким образом, проведение глюкокортикоидной терапии на 5-е сутки АО уменьшает ультраструктурные нарушения стенки эндотелия кровеносных сосудов, приводит к ограничению поступления плазмы и лейкоцитов в очаг поражения на 20-е сутки. В поздние сроки (60-е сутки) в условиях восстановленного гематотканевого транспорта возникают условия для формирования полноценных генеративных элементов, что подтверждают результаты исследования световой и электронной микроскопии.

### **Морфологическая и ультраструктурная организация яичников после глюкокортикоидной терапии, проведенной при сформировавшемся аутоиммунном оофорите**

На 45-е сутки в группе крыс с АО, получавших преднизолон, происходит увеличение численности вторичных и третичных фолликулов до показателей интактных животных. При этом ово-соматические гистионы содержат овоцит, в котором визуализируется ядро с ядрышком. Клетки гранулезы данных структур характеризуются обычным строением, текальная оболочка не изменена. Одновременно присутствуют патологически измененные фолликулы. Повреждения, в основном, представлены дисконкомплексацией клеток гранулезы, структурными изменениями блестящей оболочки, гомогенизацией ядерного материала или укрупнением и смещением ядрышка к периферии. В окружении данных структур присутствует лимфоплазмочитарная инфильтрация, однако последняя выражена несколько меньше, чем в аналогичные сроки в группе сравнения. Значительное количество желтых тел характеризуется обычным строением, иногда встречаются лютеиновые тела с признаками нарушения гемодинамики. В мозговом веществе в значительной части сосудов отмечается ослабевание застойных процессов. Процессы экссудации встречаются достаточно редко, очаги пролиферации клеток фибробластического ряда встречаются редко. Вероятно, подобный эффект, реализуется вследствие способности преднизолон подавлять активность фибробластов [Машковский М.Д., 2002]. Тканевые базофилы располагаются в интерстициальной ткани рядом с кровеносными сосудами, чаще без признаков дегрануляции.

К 60-м суткам опыта содержание вторичных и третичных фолликулов возрастает по сравнению с таковым в первой контрольной группе. Указанные структуры претерпевают патологические изменения со стороны овоцитов (отек цитоплазмы, укрупнение и смещение ядрышка к периферии), эпителиоцитов гранулезы (дисконкомплексация, десквамация) и эндокриноцитов теки (лимфоплазмочитарная инфильтрация теки). Количество первичных фолликулов снижено, у некоторых овоцит разрушен, а фолликулоциты дисконкомплексированы. Обращает на себя

внимание наличие умеренно-выраженной, местами усиливающейся лимфоплазмочитарной инфильтрации в окружении фолликулярного аппарата. Неизменные генеративные элементы встречаются достаточно редко и представлены фолликулами различной степени зрелости. В мозговом веществе наблюдается усиление гемодинамических нарушений. Сосуды венозного типа становятся более полнокровными, местами в них определяется тромбоз и периваскулярный отек. Процессы фиброобразования соединительной ткани к 60-м суткам эксперимента слабо выражены и локализованы, главным образом, в медуллярной зоне. Периваскулярно располагаются скопления тканевых базофилов, некоторые из которых находятся в состоянии дегрануляции. Как на 45-е, так и на 60-е сутки содержание атретических фолликулов и тел увеличено.

Данные электронно-микроскопического исследования констатируют ультраструктурные перестройки, затрагивающие эндотелиальный слой кровеносных сосудов, а также фолликулярный аппарат яичников. К 60-м суткам в цитоплазме эндотелиоцитов резко возрастает содержание аутофагосом, первичных и вторичных лизосом, базальная мембрана неравномерно утолщена вследствие отека. Органеллы общего назначения в составе эндокриноцитов внутренней теки и эпителиоцитов гранулезного слоя претерпевают изменения в виде расширения цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи, повышения электронной плотности и частичной деструкции крист митохондрий.

Таким образом, проведение глюкокортикоидной терапии на 30-е сутки после окончания моделирования аутоиммунного оофорита, оказывает положительное действие сразу после ее окончания (45-е сутки) и проявляется уменьшением застойных и инфильтративных процессов. К 60-м суткам характерно возобновление гемодинамических нарушений, усиление лимфоплазмочитарной инфильтрации, сопровождающееся повреждением и патологической атрезией фолликулярного аппарата.

### **Морфоколичественное исследование яичников белых крыс с моделью аутоиммунного оофорита и в зависимости от сроков введения глюкокортикоидов**

Исследование яичников интактных животных (контроль I) указывает на отсутствие значимой возрастной динамики в течение срока проводимого эксперимента, поэтому использовались усредненные значения показателей.

Динамика содержания фолликулярного аппарата менялась в исследуемых группах по-разному.

При анализе цифровых данных группы контроля II выявлено увеличение содержания атретических фолликулов и тел до 5,59(3,65-7,98) на 1-е сутки при 1,43(0,9-2,0) в группе интактного контроля,  $p < 0,05$ . Колебания значений других генеративных элементов непосредственно

после окончания введения ГКС не обнаружено. В дальнейшем (15,40-е сутки) количество атретических структур, желтых тел, примордиальных, первичных, вторичных и третичных фолликулов остается относительно стабильным и не различается с таковыми из группы контроля I ( $p > 0,05$ ).

ГКС терапия, проведенная на 5-е сутки АО, оказывает определенное положительное влияние сразу после ее окончания, и, особенно, в поздние сроки эксперимента.

На 20-е сутки в основной группе А количество желтых тел возрастает до 11,36(9,23-15,06), при этом среднее содержание третичных фолликулов - 2,23(2,03-2,52) не отличается от аналогичных показателей группы контроля I (2,0(1,0-2,51);  $p > 0,05$ ), что свидетельствует о протекании нормального роста и созревания некоторой части фолликулов, заканчивающихся овуляцией и формированием желтых тел. В группе сравнения в аналогичный срок среднее содержание желтых тел (10,04(8,0-12,65)) не различается с таковым из первой контрольной группы (9,51(8,53-10,3);  $p > 0,05$ ), однако количество третичных фолликулов снижается до 1,32(1,01-3,54), ( $p < 0,05$  к группе интактного контроля).

На 20-е сутки моделирования АО количество вторичных фолликулов увеличивается до 6,56(3,34-11,08) при 4,3(3,06-4,41) в группе интактного контроля,  $p < 0,05$ . Статистически значимое снижение содержания вторичных фолликулов - 2,09(2,03-4,09) на 20-е сутки в группе животных, получавших ГКС терапию, можно расценивать, как защитно-приспособительную реакцию, направленную на торможение процессов рекрутирования примордиальных фолликулов и сохранение репродуктивного потенциала половых желез.

В поздние сроки эксперимента (60-е сутки) в основной А группе среднее количество примордиальных (4,21(2,07-5,43)), первичных (1,53(1,09-3,54)), вторичных (4,11(4,0-7,56)) и третичных фолликулов (1,32(1,06-2,12)), желтых тел (11,01(8,1-14,23)) достоверно не отличается от зарегистрированных у интактных животных,  $p > 0,05$ . Количество атретических фолликулов и тел снижается по сравнению с показателями группы сравнения, однако не достигает значений первой контрольной группы.

ГКС терапия, проведенная на 30-е сутки АО (основная группа Б), непосредственно после ее окончания (45-е сутки) вызывает нормализацию содержания вторичных (3,02(3,0-4,21)) и третичных фолликулов (2,13(2,09-3,08)), желтых тел (8,34(6,01-11,0)), о чем свидетельствует соответствие количества указанных структур уровню интактного контроля ( $p > 0,05$ ). В группе сравнения к указанному сроку отмечается уменьшение содержания примордиальных (2,51(2,01-3,05)), первичных (1,52(1,05-3,08)) и третичных фолликулов (1,02(1,0-1,52)), желтых тел (6,51(5,53-8,51)), при возрастающих показателях вторичных фолликулов - 10,78(5,95-11,59) и атретических фолликулов и тел.

В поздние сроки (60-е сутки) в основной Б группе возрастание количества вторичных (7,65(7,12-15,41)) и третичных фолликулов (4,02(3,21-4,56)) ассоциируется с неизменным количеством желтых тел (8,1(6,67-10,54)) и снижением содержания примордиальных (2,01(1,1-3,03)) и первичных фолликулов (2,1(1,51-2,3)) при возрастании атретических фолликулов и тел.

В группе сравнения к 60-м суткам отмечаются глубокие нарушения фолликулогенеза в виде резкого снижения содержания примордиальных (1,01(1,0-2,06)) и первичных фолликулов (1,07(1,0-2,1)), желтых тел (7,1(4,05-8,21)), количество вторичных фолликулов 3-хкратно возрастает (11,79(9,05-13,59)), однако третичные фолликулы в срезе яичников не определяются.

Показатели удельного объема в сравниваемых группах согласуются с результатами представленного ранее количественного исследования. Исключение составляют удельный объем вторичных (7,79(5,4-10,26),%) и третичных (8,02(3,6-14,03)%) фолликулов в основной группе Б на 60-е сутки и стереометрические показатели вторичных фолликулов в группе сравнения на 20-е (6,1(3,14-7,39)%) и 45-е (5,41(2,55-7,03)%) сутки. Удельный объем перечисленных структур достоверно не отличается от такового у интактных крыс, однако при подсчете данные показатели возрастают ( $p < 0,05$  к группе интактного контроля), что свидетельствует об ускоренном рекрутировании фолликулярного аппарата в группе сравнения и группе крыс, получавших преднизолон на 30-е сутки заболевания. При введении преднизолона на 5-е сутки АО подобной динамики не наблюдается. Удельный объем вторичных (4,03(2,58-8,31)%), третичных (8,0(5,7-13,12)%) фолликулов и желтых тел (58,19(39,76-70,44)%) на 60-е сутки соответствует таковому в первой контрольной группе ( $p > 0,05$ ).

Нормализация удельного объема сосудов, зарегистрированная в основной группе А на 20-е (2,94(2,11-4,1)%) и 60-е (3,56(2,76-6,14)%) сутки свидетельствует о восстановлении гемодинамического равновесия после проведенного лечения. При введении преднизолона в разгар заболевания снижение стереометрических показателей сосудистых элементов до значений крыс первой контрольной группы не происходит (6,28(3,98-8,15)% на 45-е сутки и 6,14(5,66-6,31)% на 60-е сутки), что является косвенным отражением сосудистых реакций (расширение просвета сосудов, гиперемия, стаз), выявляемых в основной группе Б на 45-е и 60-е сутки и группе сравнения на 20-е (4,69(3,77-5,63)%), 45-е (6,37(4,81-10,98)%) и 60-е (5,53(4,57-8,09)%) сутки эксперимента.

Снижение удельного объема интерстициальной ткани в основной группе А (13,1(11,09-25,8)% на 20-е сутки и 23,45(21,3-26,66)% на 60-е сутки), вероятно, связано с увеличением объемов лютеиновых (72,66(53,0-78,7)%) и атретических тел и фолликулов (5,34(3,44-9,81)%)



на 20-е сутки, на 60-е – за счет повышения удельного объема атретических структур (6,11(3,23-7,76)%).

Распределение в сторону уменьшения удельного веса интерстициальной ткани в группе сравнения на 20-е (20,39(15,8-22,32)%) и 45-е сутки (14,02(11,05-17,6)%) и основной группе Б на 60-е сутки (16,55(15,8-18,15)%) может быть обусловлено, прежде всего, с избыточным ростом и атрезией фолликулярного аппарата.

Таким образом, результаты морфоколичественного исследования отражают планомерное восстановление процессов фолликулогенеза в основной группе А, проявляющееся нормализацией соотношения фолликулов разных стадий развития и сохранением когорты примордиальных фолликулов вплоть до поздних сроков эксперимента. Лечение сформировавшегося АО сдерживает рост фолликулов на 45-е сутки, однако в поздние сроки наблюдается возобновление усиления их роста, что приводит к уменьшению пула примордиальных фолликулов на 60-е сутки опыта.

Интерес представляют повышенные морфоколичественные показатели атретических фолликулов и тел, зафиксированные как в основной группе (А и Б) во всех точках эксперимента, так и в группе здоровых животных, получавших преднизолон, сразу после окончания его введения (1-е сутки). Подобные явления могут быть связаны со способностью преднизолон уменьшать синтез провоспалительных цитокинов [Харкевич Д.А., 2010; Barnes P.J., 1998; Jaffuel D., Mathieu M., Godard P., 1999], участвующих в норме в овуляторном и атретическом процессах [Волкова О.В., Боровая Т.Г., 1999]. Возможно, изменения интраовариального цитокинового микроокружения приводят к нарушению дифференцировки фолликулов с выходом части из них (большей, чем в физиологических условиях) на путь атрезии.

### **Серологическая оценка аутоиммунного процесса в яичниках и овариального резерва**

Исследование сыворотки крови животных с моделью АО выявило достоверное увеличение концентрации АОА на 20-е, 45-е и 60-е сутки - 4,6(4,6-4,8); 10,3(5,5-10,3) и 14,0(12,2-22,7) нг/мл, соответственно.

О снижении аутоиммунного процесса в яичниках при введении преднизолон на ранних этапах формирования заболевания свидетельствует нормализация концентрации АОА непосредственно после окончания лечения (3,6(3,4-3,9) нг/мл), и сохранение ее в пределах значений группы контроля I (2,6(1,1-4,2) нг/мл) вплоть до поздних сроков эксперимента - 2,9(2,7-4,0) нг/мл,  $p > 0,05$ . Введение преднизолон в разгар заболевания способствует снижению концентрации антител до 4,6(4,5-5,3)

нг/мл на 45-е сутки, однако нормализация концентрации АОА происходит только к 60-м суткам эксперимента - 3,3(3,0-3,6) нг/мл.

Концентрация ингибина В в группе сравнения на 20-е сутки снижается до 53,6(49,9-60,3) нг/мл, на 45-е сутки достигает значений первой контрольной группы - 66,8(61,5-70,2) нг/мл, к 60-м суткам превышает показатели интактных животных (71,4(55,2-79,6) нг/мл) более чем в три раза и составляет 237,9(148,9-569,3) нг/мл.

В основной группе А сразу после окончания лечения, а также в поздние сроки эксперимента уровень ингибина В находится в пределах референсных значений группы интактного контроля - 54,6(44,3-61,4) и 78,0(70,3-79,2) нг/мл, соответственно.

В основной группе В на 45-е сутки показатель концентрации ингибина В соответствует таковому в первой контрольной группе (75,0(73,4-84,3)). К 60-м суткам уровень данного маркера достоверно снижается по сравнению с показателями группы сравнения и составляет - 115,3(107,2-140,4) нг/мл, однако превышает значения интактных животных практически в 2 раза, что является косвенным показателем гипергонадотропного состояния и свидетельствует о формировании у животных основной группы Б вторичной недостаточности гонад.

Концентрация АМГ в сыворотке крови животных группы сравнения снижается на 45-е и 60-е сутки - 2,0(2,0-2,1) и 1,4(1,2-2,7) пг/мл соответственно, при 3,6(3,2-3,7) пг/мл в группе интактного контроля,  $p < 0,05$ . В группе крыс, получавших преднизолон на 5-е сутки АО концентрация АМГ на 20-е и 60-е сутки (3,3(3,1-3,6) и 2,9(2,9-3,0) пг/мл, соответственно) достоверно не отличается от таковой в группе интактных крыс. После ГКС терапии, проведенной на 30-е сутки АО, характерно снижение концентрации АМГ до 1,9(1,7-1,9) пг/мл на 45-е сутки и 1,08(0,9-1,2) пг/мл на 60-е сутки.

При введении ГКС на ранних этапах формирования АО признаки нормализации функционального состояния яичников на 60-е сутки подтверждаются нормализацией серологической концентрации АОА, АМГ и ингибина В во все сроки эксперимента.

Использование ГКС при сформировавшемся АО уменьшает патоморфологические изменения в половых железах непосредственно после ее окончания (45-е сутки), однако в дальнейшем (60-е сутки) наблюдается возобновление патологического процесса, сопровождающегося характерными гистологическими изменениями и снижением овариального резерва, подтвержденного уменьшением уровня АМГ и количества примордиальных фолликулов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Использование преднизолона на ранних этапах формирования аутоиммунного оофорита способствует нормализации микроциркуляции в сосудистом русле яичников, уменьшению лимфоплазмочитарной инфильтрации, восстановлению процессов роста и дифференцировки фолликулов при сохранении численной плотности примордиальных фолликулов до поздних сроков эксперимента. Указанные процессы сопровождаются нормализацией концентрации антиовариальных антител с 20-х суток эксперимента.
2. Введение преднизолона при сформировавшемся экспериментальном аутоиммунном оофорите вызывает уменьшение гемодинамических нарушений непосредственно после окончания лечения, но в дальнейшем (60-е сутки) отмечается нарастание лимфоплазмочитарной инфильтрации, повреждение и усиленная атрезия фолликулов с уменьшением пула примордиальных фолликулов, что свидетельствует о краткосрочности и недостаточной эффективности проведенной терапии. Нормализация концентрации антиовариальных антител происходит позже, на 60-е сутки.
3. Уменьшение концентрации ингибина В и антимюллеровского гормона являются свидетельством нарушения стероидогенеза и снижения овариального резерва при назначении преднизолона при сформировавшемся экспериментальном аутоиммунном оофорите. Использование преднизолона на ранних этапах формирования АО нормализует указанные показатели во все сроки эксперимента.
4. Курсовое введение преднизолона интактным животным инициирует кратковременное усиление атретических процессов (1-е сутки), не вызывает развитие гемодинамических нарушений и повреждений, затрагивающих генеративные и эндокринные элементы половых желез.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ**

1. Тупицына Т.В., Дмитриева М.Л. Влияние глюкокортикоидной терапии на морфофункциональное состояние яичников в ранние сроки экспериментального аутоиммунного оофорита // «Интеллектуальный потенциал молодых ученых России и зарубежья», Материалы IV Международной научно-практической конференции. – М.: Издательство «Спутник +». – 2012. – С.21-25.
2. Тупицына Т.В., Тихоновская О.А., Дмитриева М.Л., Логвинов С.В. Влияние глюкокортикоидов на кровеносные сосуды яичников в ранние стадии экспериментального аутоиммунного оофорита // IV Всероссийская научная конференция с международным участием «Микроциркуляция в клинической практике». - Москва. – 2012. – С.57.
3. Тупицына Т.В., Дмитриева М.Л., Логвинов С.В. Действие глюкокортикоидов на генеративный аппарат яичников в ранние сроки экспериментального аутоиммунного оофорита // Сборник материалов XIX

Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва.- 2012. - С. 584.

4. Тупицына Т.В., Дмитриева М.Л. Структурные особенности генеративных элементов яичников при экспериментальном аутоиммунном оофорите и их коррекция с помощью глюкокортикоидов на ранних стадиях заболевания // Сборник материалов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва.- 2012. - С. 584.

5. Дмитриева М.Л., Тупицына Т.В., Логвинов С.В. Структурные особенности микроциркуляции при аутоиммунном оофорите в эксперименте // IV Всероссийская научная конференция с международным участием «Микроциркуляция в клинической практике». - Москва. – 2012. – С.45.

6. Дмитриева М.Л., Тупицына Т.В. Ультраструктурные изменения фолликулов яичника при экспериментальном аутоиммунном оофорите // «Интеллектуальный потенциал молодых ученых России и зарубежья», Материалы IV Международной научно-практической конференции. – М.: Издательство «Спутник +». – 2012. – С.17-20.

7. Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А., Невоструев С.А., Логвинов С.В., Тупицына Т.В. Проявления аутоиммунных процессов в яичниках при воспалительных заболеваниях органов малого таза // **Бюллетень сибирской медицины**. - № 4. – 2012. – С. 107-110.

8. Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А., Логвинов С.В., Тупицына Т.В., Невоструев С.А. Изучение уровня ингибина В и антимюллеровского гормона при аутоиммунном оофорите в эксперименте // **Сибирский медицинский журнал**. - № 1. – 2012. – С.127-129.

9. Тупицына Т.В., Тихоновская О.А., Невоструев С.А., Дмитриева М.Л., Логвинов С.В. Влияние глюкокортикоидной терапии на морфофункциональное состояние яичников при экспериментальном аутоиммунном оофорите // **Бюллетень сибирской медицины**. - № 6. – 2012. – С. 91-95.

#### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АО - аутоиммунный оофорит  
АОА – антиовариальные антитела  
АМГ – антимюллеровский гормон  
ГКС – глюкокортикостероиды

Подписано в печать 26.06.2013 г.

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ 634050, г. Томск,  
Московский тракт, 2, тел. 53-04-08.

Заказ № 175. Тираж 100 экземпляров.