

УДК 618.11-002-092.9-085:615.357:577.175.53

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ ЯИЧНИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ООФОРИТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ

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

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

### РЕЗЮМЕ

Аутоиммунный оофорит (АО) характеризуется повреждением генеративных и эндокринных элементов яичников и приводит к формированию вторичной недостаточности гонад. Вопрос об использовании глюкокортикоидов (ГК) для коррекции АО остается дискуссионным.

**Цель исследования** – изучить электронно-микроскопические изменения структурно-тканевых элементов яичников при аутоиммунном оофорите и после его коррекции глюкокортикоидами в эксперименте.

**Материал.** Эксперимент проведен на беспородных белых половозрелых крысах-самках. Основной группе животных (12 крыс) путем интраперитонеального введения овариальных антигенов моделировали АО. С 5-х сут крысам вводили преднизолон («Никомед», Австрия) в дозе 3 мг/кг массы тела внутримышечно 14-дневным курсом. Группой сравнения (12 крыс) служили животные с моделью АО без курса ГК терапии. Контроль – интактные крысы (6 животных). Взятие материала осуществляли на 20-е и 60-е сут.

**Методы.** Изучение ультраструктуры яичников проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Материал фиксировали в 2,5%-м глютаральдегиде, постфиксировали в 2%-м растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь смол эпон-аралдит. Срезы готовили на ультратоме Ultrotom III (ЛКВ, Швеция). Для просмотра препаратов использовали электронный микроскоп JEM-7A (Япония).

**Результаты.** На 20-е сут экспериментального АО возникают существенные ультраструктурные изменения сосудов, касающиеся, главным образом, эндотелиального слоя. Дегенеративным и деструктивным изменениям подвержены эндокриноциты в составе теки и гранулезы, овоциты большинства антральных фолликулов. К 60-м суткам в патологические процессы вовлечены и преантральные фолликулы, в мозговом веществе развиваются периваскулярные фиброзно-склеротические изменения. Проведение ГК терапии на 5-е сут АО уменьшает ультраструктурные нарушения стенки кровеносных сосудов, ограничивает миграцию иммунокомпетентных клеток в очаг поражения на 20-е сут. К 60-м сут в условиях восстановленного гематотканевого транспорта происходит формирование полноценных генеративных элементов, подтвержденное с помощью результатов электронно-микроскопического исследования.

**Вывод.** Полученные экспериментальные данные демонстрируют терапевтическую эффективность ГК-терапии на ранних стадиях АО.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** аутоиммунный оофорит, глюкокортикоидная терапия, электронная микроскопия.

### Введение

Аутоиммунный оофорит (АО) является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием, в патогенезе которого ведущая роль принадлежит аутоиммунному поражению стероидпродуцирующих клеток яичников, приводящему к их гормональной недоста-

точности и угнетению фолликулогенеза [1]. В настоящее время в ходе клинических и экспериментальных работ изучаются вопросы, касающиеся профилактики и лечения АО [2, 3–5]. При этом среди множества предлагаемых фармакологических средств, как правило, упоминаются препараты глюкокортикоидного ряда. Целесообразность их использования при аутоиммунном поражении яичников является дискуссионной в связи с отсутствием теоретически обоснованных суточных и курсовых доз,

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

оптимальных сроков назначения, а также неясности морфологических и ультраструктурных изменений, происходящих под действием данной терапии.

Цель исследования – изучить электронно-микроскопические изменения основных структурно-тканевых элементов яичников при аутоиммунном оофорите и после его коррекции с помощью глюкокортикоидов в эксперименте.

## Материал и методы

Эксперимент проведен на беспородных белых половозрелых крысах-самках. Проведение эксперимента регламентировано разрешением этического комитета Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) № 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 внутривбрюшинно пятикратно через день в фазах покоя эстрального цикла (№ 2439712 от 10.01.2012 г.). На 5-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 ГК-терапии. Контроль – интактные крысы (6 животных). Длительность эксперимента составила 60 сут. Взятие материала осуществляли на 20-е и 60-е сут после последнего введения антигена. Животных выводили из эксперимента в фазу диэструса (кольпоцитологический 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. Изучение ультраструктуры яичников проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии. Материал фиксировали в 2,5%-м глутаральдегиде, забуференном на какодилатном буфере концентрацией 0,2 моль (рН 7,4). Далее постфиксировали в 2%-м растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь смол эпон-аралдит. На ультратоме Ultratome III (LKB, Швеция) готовили полутонкие и ультратонкие срезы («Вирион»). Полученные препараты просматривали и фотографировали с помощью электронного микроскопа JEM-7A (Япония.)

## Результаты

Электронно-микроскопическое исследование яичников на 20-е сут АО выявило дегенеративные и деструктивные изменения, затрагивающие значительную часть фолликулов.

Овоцит в ряде фолликулов содержит крупное ядро, хроматин гомогенизирован и концентрируется по периферии. Содержание органелл и включений в цитоплазме снижено. Гранулярная эндоплазматическая сеть и комплекс Гольджи редуцированы, уменьшено содержание рибосом. Митохондрии характеризуются деструкцией крист.

Клетки фолликулярного эпителия растущих фолликулов имеют кубическую форму, содержат расширенные цистерны эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Количество митохондрий невелико, некоторые из них отличаются повышенной электронной плотностью матрикса. Содержание гормональных гранул и включений умеренное или снижено. В ряде случаев можно обнаружить грубые деструктивные изменения фолликулоцитов, когда ядра в них пикнотичны, с неравномерно высокой электронной плотностью кариоплазмы и гомогенизированным хроматином. Ядерная оболочка большей частью разрушена, а содержимое ядра распадается на глыбки.

Базальная мембрана фолликулов на многих участках имеет неравномерную толщину, при этом локальные утолщения чередуются с истончениями.

Текальные эндокриноциты также подвергаются деструктивным изменениям. Цитоплазма содержит умеренное или низкое содержание гранул и липидных вакуолей. Цистерны эндоплазматической сети и комплекса Гольджи расширены, встречаются в небольшом количестве. Митохондрии отекающие, некоторые с деструкцией крист. Кроме того, в наружной и внутренней текальной оболочке обнаруживаются единичные лимфоциты. Некоторые эндокриноциты вовлекаются в деструктивные процессы. Ядра в них пикнотичны, с высокой электронной плотностью кариоплазмы и гомогенизированным хроматином. Цитоплазма описываемых клеток характеризуется низкой электронной плотностью.

Следует отметить, что наиболее выраженные ультраструктурные изменения касаются главным образом вторичных и третичных фолликулов, первичные фолликулы на данных сроках эксперимента вовлекаются в патологические процессы гораздо реже либо характеризуются обычной ультраструктурой.

Помимо перечисленных изменений фолликулярного аппарата выявлены ультраструктурные изменения стенки сосудов. Эндотелиоциты значительной части гемокapилляров и венул в мозговом и корковом веществе становятся отекающими, выбухая в просвет

сосуда. Цитоплазма обладает низкой электронной плотностью. Немногочисленные митохондрии набухшие, с просветленным матриксом и частичной деструкцией крист. Цистерны эндоплазматической сети умеренно расширены. Концентрация свободных рибосом невелика, содержание микровезикул умеренное либо повышено.

Базальная мембрана под эндотелием иногда разрыхлена и неравномерно утолщена вследствие отека (рис. 1). Перициты в стенке гемокapилляров, как правило, не изменены. Крайне редко можно встретить перициты с явлениями перинуклеарного отека и повышенной степени конденсации хроматина. Гладкие миоциты артерий и вен в большинстве своем сохраняют обычную ультраструктуру миофибрилл, и только некоторые органеллы общего назначения (митохондрии, эндоплазматическая сеть) характеризуются не резко выраженным набуханием.

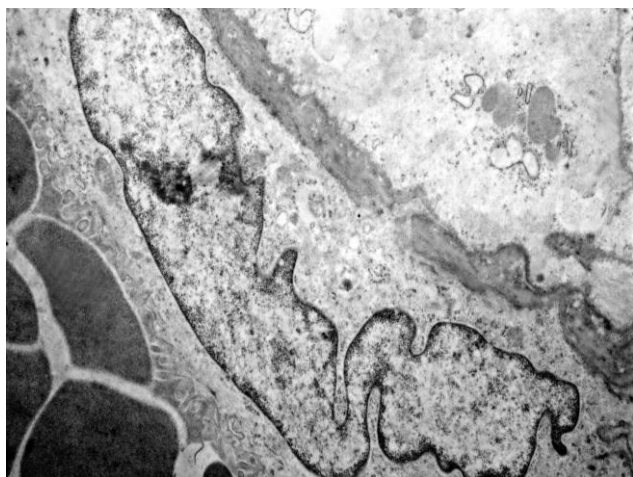


Рис. 1. Отечные изменения базальной мембраны эндотелиоцита на 20-е сут экспериментального воспаления. Ув. 3 000

Среди элементов периваскулярной соединительной ткани в рассматриваемый период воспаления весьма часто обнаруживаются лимфоциты и тканевые базофилы. В цитоплазме тучных клеток, а также за ее пределами располагаются неодинаковой величины и электронной плотности гранулы. Вокруг части гранул имеется просветленный ободок цитоплазмы (рис. 2).

К 60-м сут АО вышеописанные изменения фолликулярного аппарата сохраняются, кроме того, встречается разрастание коллагеновых волокон под базальной мембраной фолликулоцитов гранулезного слоя. Первичные генеративные элементы чаще вовлекаются в патологические процессы, примордиальные фолликулы характеризуются обычным строением.

В мозговом веществе яичника встречаются зрелые формы фибробластов с хорошо развитой гранулярной эндоплазматической сетью и признаками синтеза кол-

лагена. Большинство коллагеновых фибрилл обладают хорошо выраженной поперечной исчерченностью, однако склеротические изменения соединительной ткани локализуются главным образом периваскулярно. Тканевые базофилы располагаются рядом с сосудами, а также в интерстициальной ткани без признаков активной дегрануляции.

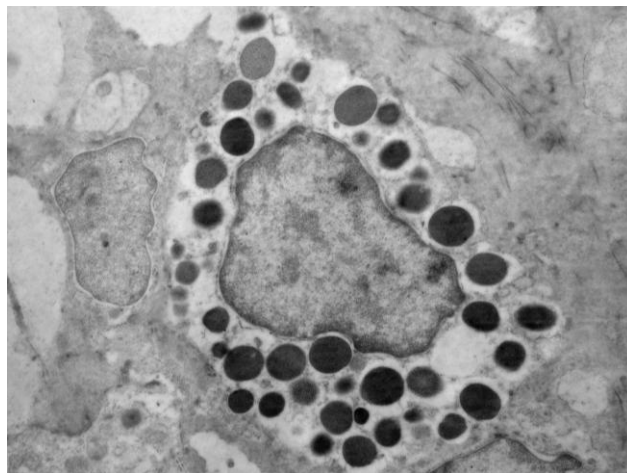


Рис. 2. Тканевый базофил в мозговом веществе яичника на 20-е сут аутоиммунного оофорита. Ув. 3 000

В основной группе животных непосредственно после окончания глюкокортикоидной терапии (20-е сут) выявлены сходные по характеру (как в аналогичные сроки в группе сравнения) ультраструктурные нарушения, затрагивающие значительное количество генеративных элементов. Существенных изменений не обнаруживает лишь некоторая часть первичных фолликулов. Кроме того, обращает на себя внимание заметное уменьшение содержания клеток лимфоцитарного ряда в мозговом и корковом веществе яичников. В окружении преантральных фолликулов инфильтративные явления, как правило, отсутствуют либо представлены одной или двумя клетками лимфоцитарного ряда. Тканевые базофилы встречаются крайне редко, без признаков дегрануляции.

После 2-недельного курса глюкокортикоидной терапии на люминальной поверхности эндотелиоцитов располагаются немногочисленные микроворсинки. Просвет большинства капилляров открыт и содержит эритроциты. Цитоплазма обладает обычной для данного типа клеток электронной плотностью, содержит микровезикулы, свидетельствующие об умеренном гематотканевом транспорте. В большинстве эндотелиоцитов содержание органелл невелико, они не обнаруживают выраженных ультраструктурных изменений. Иногда выявляются расширенные цистерны эндоплазматической сети, а также отежные

митохондрии. Базальная мембрана чаще не изменена, крайне редко обнаруживаются ее утолщения.

Эндотелий и базальная мембрана артериальных и венозных сосудов чаще характеризуется аналогичными вышеописанными ультраструктурными особенностями. Большинство гладких миоцитов в средней оболочке сохраняют обычную ультраструктуру миофиламентов и органелл общего значения. В небольшой части миоцитов обнаруживаются явления дегенерации в виде наличия в цитоплазме единичных мембранных комплексов.

К 60-м сут в группе животных, получавших преднизолон, вышеописанное состояние сосудистых элементов и соединительной ткани сохраняется. Вместе с тем в некоторых участках мозгового и коркового вещества яичника обнаруживаются макрофаги. Ядро их округлой либо неправильной формы с преимущественной конденсацией хроматина у ядерной оболочки. В цитоплазме некоторых весьма выражен лизосомально-вакуолярный аппарат, представленный многочисленными первичными и вторичными лизосомами, фагосомами с содержимым различной электронной плотности. Межклеточное вещество вблизи указанных клеток содержит окруженные мембраной везикулы, мембранные комплексы. Коллагеновые фибриллы в описываемых участках рассредоточены, утрачивают характерную исчерченность. Нередко в цитоплазме макрофагов обнаруживаются крупные фагосомы с многокамерными полостями, содержащие мелкозернистый материал. Вокруг данных клеток выявлено рассредоточение и лизис коллагеновых фибрилл.

Значимые ультраструктурные преобразования касаются также фолликулярного аппарата яичников. Ооциты растущих, зрелых и примордиальных фолликулов, как правило, не обнаруживают выраженных ультраструктурных нарушений. Фолликулярный эпителий имеет обычную ультраструктуру. Цитоплазма эпителиоцитов характеризуется умеренным содержанием свободных рибосом, цистерн гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, митохондрий. В единичных ядрах клеток зернистого слоя имеют место гиперконденсация хроматина, а также отечные изменения части органелл.

Базальная мембрана, отделяющая зернистый слой от внутренней теки, в растущих фолликулах после проведенной терапии обладает умеренной электронной плотностью, равномерна по толщине. Очень редко удается выявить очаговые утолщения базальной мембраны с явлениями пролиферации в ней фибриллярных структур.

В клетках теки довольно многочисленны митохондрии, некоторая часть из которых отечна, с очаго-

вой деструкцией крист и просветленным матриксом, умеренное содержание лизосом, цистерн гранулярной эндоплазматической сети. Содержание липидных включений варьибельно в текальных эндокриноцитах в зависимости от стадии секреторного цикла (рис. 3).

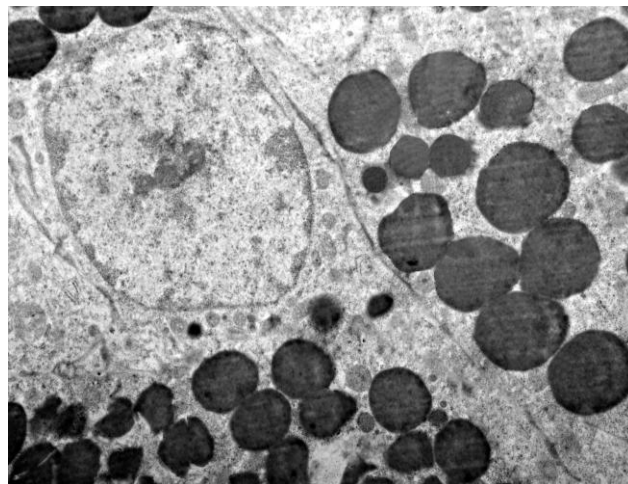


Рис. 3. Высокое содержание осмиофильных включений в цитоплазме текальных эндокриноцитов на 60-е сут эксперимента после глюкокортикоидной терапии, проведенной на 5-е сут заболвания. Ув. 3 000

Эндокриноциты желтых тел в стадии расцвета непосредственно после окончания глюкокортикоидной терапии, а также в поздние сроки эксперимента содержат в цитоплазме многочисленные осмиофильные липидные включения. Из органелл преобладают митохондрии, цистерны гладкой и гранулярной эндоплазматической сети. В желтых телах на стадии регресса часть эндокриноцитов пикноморфна, иногда среди последних встречаются макрофаги.

## Обсуждение

На 20-е сут экспериментального аутоиммунного оофорита возникают существенные ультраструктурные изменения кровеносных сосудов яичников, касающиеся прежде всего эндотелиального слоя. Наблюдаются дегенеративные и деструктивные процессы большинства вторичных и третичных фолликулов. При этом кариопикноз части фолликулярных эпителиоцитов, деструкция овоцитов, утолщения и дефекты базальной мембраны указанных генеративных элементов, вероятно, приводят к нарушению гематофолликулярного барьера и патологической атрезии. В более поздние сроки (60-е сут) в мозговом веществе яичников преимущественно периваскулярно развиваются фиброзно-склеротические изменения соединительной ткани, проявляющиеся увеличением содержания компактно расположенных пучков коллагеновых фибрилл. Проведение

глюкокортикоидной терапии на 5-е сут аутоиммунного воспаления яичников уменьшает ультраструктурные нарушения стенки сосудов, приводит к существенному уменьшению лимфоноцитарной инфильтрации, ограничивает миграцию и активность (дегрануляцию) тканевых базофилов в очаге поражения на 20-е сут. В поздние сроки (60-е сут) происходит активизация деятельности макрофагов, что препятствует периваскулярному разрастанию соединительной ткани и, соответственно, восстановлению адекватного гематоканевого транспорта. Таким образом, возникают условия для формирования полноценных фолликулов, что подтверждают результаты электронно-микроскопического исследования.

## Вывод

Полученные экспериментальные данные демонстрируют терапевтическую эффективность ГК-терапии на ранних стадиях АО.

## Литература

1. Айламазян Э.К., Габелова К.А., Гззян А.М., Потин В.В. Аутоиммунный оофорит (патогенез, диагностика,

- перспективы лечения) // Акушерство и гинекология. 2002. № 2. С. 7–9.
2. Серов В.Н., Царегородцева М.В., Кожин А.А., Жаров Е.В. Механизмы формирования аутоиммунного оофорита у женщин с хроническим воспалением придатков матки // Журн. Рос. общества акушеров-гинекологов. 2006. № 4. С. 32–34.
  3. Серов В.Н., Царегородцева М.В., Кожин А.А. Клинико-иммунологические факторы в формировании аутоиммунной овариальной недостаточности воспалительного генеза // Акушерство и гинекология. 2007. № 6. С. 28–33.
  4. Berberian V., Sánchez S., Sánchez-Borzona M. Effect of alpha-melanotropin hormone on serum levels of luteinizing hormone and progesterone in experimental rat autoimmune oophoritis // Peptides. 2006. Vol. 27, № 9. P. 2295–2299.
  5. La Marca A., Brozzetti A., Sighinolfi G., Marzotti S., Volpe A., Fallorni A. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes // Current opinion in obstetrics et gynecology. 2010. Vol. 22, № 4. P. 277–282.

Поступила в редакцию 24.12.2012 г.

Утверждена к печати 10.04.2013 г.

Тупицына Татьяна Владимировна (✉) – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

Логвинов Сергей Валентинович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

Тихоновская Ольга Анатольевна – д-р мед. наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии СибГМУ (г. Томск).

Дмитриева Маргарита Леонидовна – канд. мед. наук, ординатор кафедры акушерства и гинекологии СибГМУ (г. Томск).

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

## ULTRASTRUCTURAL INFRINGEMENTS OF OVARIES AT EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE OOPHORITIS AND THEIR CORRECTION BY GLUCOCORTICOIDS

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

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

### ABSTRACT

Autoimmune oophoritis (AO) is characterized by damage of generative and endocrine elements of the ovaries and leads to the formation of secondary insufficiency of the gonads. A question about the use of glucocorticoids (GC) for the correction of AO remains debatable.

**Objective:** to study the electron-microscopic changes of structural-tissue cells in autoimmune ovarian oophoritis and after its correction by glucocorticoids in the experiment.

**The material.** The experiment was performed on outbred white Mature rats-female. The main group of ani-

mals (12 rats) were simulated AO by intra-peritoneal introduction of antigens of ovarian. At 5<sup>th</sup> day prednisolone was injected to rats («Nycomed», Austria) in the dose of 3 mg/kg of body weight intramuscularly 14-day course. A comparison group (12 rats) were the animals with the model AO no course Ledger therapy. Control - intact rats (6 animals). Taking of the material was carried out by the 20<sup>th</sup> and the 60<sup>th</sup> day.

**Methods.** The study of the ultrastructure ovaries were performed using transmission electron microscopy. The material was fixed 2.5% glutaraldehyde, postfixed in 2% solution of osmium tetroxide, dehydrated in ethyl alcohols rising concentration and placed in a mixture of resins Epon-Araldite. Sections were prepared on Ultratome III (LKB, Sweden). To view the drugs used an electron microscope JEM-7A (Japan).

**Results.** On the 20<sup>th</sup> day of the pilot AO there are significant ultrastructural changes of vessels, concerning mainly endothelial layer. Degenerative and destructive changes affected endocrinocytes in the composition of the libraries and granular, овоциты majority of antral follicles. The 60-day pathologic processes involved and preantral follicles in the medulla develop perivascular fibrosis-sclerotic changes. Holding GC therapy on the 5<sup>th</sup> day AO reduces ultrastructural breach the walls of blood vessels, limits migration of immune cells in the home defeat on the 20<sup>th</sup> day. By the 60<sup>th</sup> day in the conditions of the restored the blood tissue transport is the formation of full-fledged generative elements, confirmed by the results of electron microscopy study.

**Conclusion.** The obtained experimental data are demonstrated the therapeutic efficacy of the GC-therapy in the early stages of AO.

**KEY WORDS:** autoimmune oophoritis, treatment with glucocorticoids, electron microscopy.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2013, vol. 12, no. 3, pp. 76–81

#### References

1. Ailamazyan Ye.K., Gabelova K.A., Gzgzyan A.M., Potin V.V. *Obstetrics and Gynecology*, 2002, no. 2, pp. 7–9 (in Russian).
2. Serov V.N., Tsaregorodtseva M.V., Kozhin A.A., Zharov Ye.V. *Journal of the Russian society of Accoucheurs-Gynecologists*, 2006, no. 4, pp. 32–34 (in Russian).
3. Serov V.N., Tsaregorodtseva M.V., Kozhin A.A. *Obstetrics and Gynecology*, 2007, no. 6, pp. 28–33 (in Russian).
4. Berberian V., Sánchez S., Sánchez-Borzone M. Effect of alpha-melanotropin hormone on serum levels of luteinizing hormone and progesterone in experimental rat autoimmune oophoritis. *Peptides*, 2006, vol. 27, no. 9, pp. 2295–2299.
5. La Marca A., Brozzetti A., Sighinolfi G., Marzotti S., Volpe A., Fallorni A. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes. *Current opinion in obstetrics et gunecology*, 2010, vol. 22, no. 4, pp. 277–282.

**Tupitsyna Tatiana V.** (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Logvinov Sergey V.**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Tikhonovskaya Olga A.**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Dmitrieva Margarita L.**, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Tupitsyna Tatiana V.**, Ph. +7-923-403-6833; e-mail: tupicyna85@mail.ru