

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ИНГИБИНА В И АНТИМЮЛЛЕРОВСКОГО ГОРМОНА ПРИ АУТОИММУННОМ ООФОРИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздравсоцразвития России, Томск
E-mail: margarita0708@yandex.ru

STUDY OF INHIBIN B LEVEL AND ANTI-MULLERIAN HORMONE IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE OOPHORITIS

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

Siberian State Medical University, Tomsk

Цель исследования: оценить динамику концентрации ингибина В и антимюллеровского гормона (АМН) на этапах формирования аутоиммунного поражения яичников в эксперименте на белых беспородных половозрелых крысах-самках с оригинальной моделью аутоиммунного оофорита (АО). Исследование яичников проведено гистологическими и гистохимическими методами; определение концентрации антиовариальных антител (АОА), ингибина В и АМН в сыворотке крови – иммуноферментным анализом. Установлено, что окончательное формирование АО происходило к 30-м суткам эксперимента, что подтверждалось статистически значимым увеличением концентрации АОА. Повышение удельного объема первичных и вторичных фолликулов к 60-м суткам эксперимента сопровождалось увеличением концентрации ингибина В, обусловленным селективным повреждением текальной оболочки растущих фолликулов. Изменения концентрации АМН в различные сроки эксперимента не отмечено.

Ключевые слова: аутоиммунный оофорит, антиовариальные антитела, ингибин В, антимюллеровский гормон, яичники.

The aim of the study was to assess the dynamics of the concentration of inhibin B and anti-Mullerian hormone (AMH) at stages of the autoimmune destruction of ovaries in experiments on mature females of white rats with the original model of autoimmune oophoritis (AO). The study was performed using histological and histochemical studies of ovaries and determination of the concentration of antiovarian antibodies (AOA), inhibin B and AMH in serum by enzyme immunoassay. The final formation of the AO occurred on the 30th day of the experiment, which was confirmed by significant increase of the concentration of AOA. The increase of the specific volume of primary and secondary follicles to the 60th day of the experiment was accompanied by an increase in the concentration of inhibin B, caused by selective theca cell destruction of growing follicles. Change in concentration of AMH was observed in different periods of the experiment.

Key words: autoimmune oophoritis, antiovarian antibodies, inhibin B, anti-Mullerian hormone, ovaries.

Введение

При клинических состояниях, сопровождающихся снижением овариального резерва, то есть отсутствием овуляции на экзогенную и эндогенную стимуляцию, по данным некоторых авторов, важную роль играет аутоиммунный процесс [2, 6, 7, 11]. Дискутируется значение ингибина В и антимюллеровского гормона (АМН) для оценки овариального резерва. Ингибин В представляет собой гликопротеин, который синтезируется клетками гранулезы и считается селективным ингибитором фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). В свою очередь, АМН представляет собой гликопротеин, принадлежащий к семейству β -трансформирующих факторов роста, который вырабатывается в организме женщины клетками гранулезы растущих фолликулов диаметром 2–6 мм в небольшом количестве [1, 3]. Определение данных маркеров входит в классические схемы обследования пациенток с бесплодием и при планировании экстракорпорального оплодотворения, в том числе при проведении EFORT-теста (физиологический ответ яичников на экзогенную стимуляцию фолликулостимулирующим гормоном) [1].

По данным С.К. Welt et al. (1999), повышение уровня ФСГ сопровождается сниженными уровнями эстрогенов и ингибина В, что может служить первым признаком развивающейся овариальной недостаточности. То есть по мере сокращения пула растущих фолликулов снижается продукция ингибина В, что ведет к повышению ФСГ. В свете сказанного оценка концентрации ингибина В и АМН и их соотношений в различные сроки формирования аутоиммунного оофорита (АО) представляет как теоретическое, так и прикладное значение. Цель исследования: оценить динамику концентрации ингибина В и АМН на этапах формирования аутоиммунного поражения яичников в эксперименте.

Материал и методы

Эксперимент выполнялся на беспородных белых половозрелых крысах-самках. На проведение эксперимента получено разрешение этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России № 1231 (от 21.12.2009 г.). Основной группе животных (n=30) для индуцирования развития АО проводилась иммунизация

по оригинальной методике (положительное решение о выдаче патента на изобретение № 2010130628 от 2.09.2011 г.). Для этого внутрибрюшинно пятикратно через день в фазах покоя эстрального цикла вводили дополнительно очищенный трехкратным замораживанием антиген, представляющий собой экстракт яичников интактных животных. Группа контроля состояла из 5 интактных животных. Длительность эксперимента составила 60 сут. Взятие материала осуществляли на 5, 10, 15, 30, 60-е сутки после последнего введения антигена. Животных выводили из эксперимента в фазу диэструса (кольпоцитологический контроль) под эфирным наркозом декапитацией 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, после чего проводили гистохимическое исследование (по Браше, ШИК-реакция). Определяли концентрацию антиовариальных антител – АОА (нг/мл), ингибина В (пг/мл) и АМН (нг/мл) методом иммуноферментного анализа – ИФА (ООО «ДиаТомПлюс», Томск). Для количественной оценки морфологических изменений в яичниках выполнялась морфометрия в соответствии с руководством Г.Г. Автандилова (1990). Подсчет примордиальных, первичных, вторичных и третичных фолликулов, атретических фолликулов и тел, желтых тел производили на серийных срезах через каждые 150–200 мкм с использованием окулярной измерительной сетки. Последняя представляет собой большой квадрат, содержащий 25 точек. Удельный объем определяли согласно фундаментальному принципу стереологии Кавальери–Акера–Глаголева.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программы «SPSS® 17.0» (© SPSS Inc.) методами описательной статистики с вычислением медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_1 – Q_4). При распределении значений, отличных от нормального, выборки сравнивались непараметрическим методом – U-тестом Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Морфологически АО проявлялся мононуклеарной

инфильтрацией в окружении фолликулярного аппарата, формированием фолликулярных кист, дисконфлексацией и десквамацией фолликулярного эпителия, дистрофией с последующей деструкцией овоцитов, усилением атрезии. Перечисленные изменения соответствовали описанным ранее M. Damjanovic et al. (1989) и A. La Marca et al. (2010) [4, 8]. Особое внимание заслуживает постепенное развитие перечисленных изменений. Инфильтрация нарастала от единичных мононуклеаров в области сосудов (на 5-е сутки) до инфильтрации внутренней и наружной теки растущих фолликулов – к 30-м суткам. Овоциты претерпевали дегенеративные изменения в виде отека цитоплазмы, укрупнения ядрышка и деструкции практически во всех фолликулах к 30 и 60-м суткам эксперимента. Фолликулярные кисты присутствовали в 15% случаев и встречались во все сутки эксперимента.

При морфоколичественном анализе установлено, что удельный объем растущих фолликулов статистически значимо отличался от такового в группе контроля. На 5, 10, 15, 30-е сутки эксперимента количество и удельный объем первичных и вторичных фолликулов в срезах яичников оказалось ниже, чем в контроле. Минимальный удельный объем вторичных фолликулов зафиксирован на 15-е сутки эксперимента и составлял 1,14 (0,46–2,11)% против 5,69 (3,63–8,69)% в контроле ($p=0,001$). Однако к 60-м суткам эксперимента данный показатель резко увеличивался в сравнении с зарегистрированным на 30-е сутки и составил 11,98 (7,82–14,75)%. Удельный объем третичных фолликулов на 5, 10, 15, 30-е сутки эксперимента не отличался от такового в контроле. Вместе с тем третичные фолликулы на 60-е сутки эксперимента не обнаруживались. Удельный объем желтых тел статистически значимо уменьшился только к 30-м суткам эксперимента. На фоне сниженного роста фолликулов и формирования кист увеличилось содержание атретических фолликулов и тел. Максимальный удельный объем атретических фолликулов и тел наблюдался на 15-е сутки эксперимента – 13,91 (6,93–18,6)% против 1,37 (0,45–2,16)% в контроле ($p=0,001$), сохраняясь статистически значимо более высоким и на 30–60-е сутки эксперимента.

При исследовании уровня АОА в сыворотке крови статистически значимое его увеличение наблюдалось на 30 и 60-е сутки эксперимента (таблица). Концентрация ингибина В в сыворотке крови животных с индуцированным АО к 60-м суткам эксперимента увеличилась почти в 3 раза, тогда как в остальные сроки исследования соответствовала таковой в группе контроля. Содержание АМН в сыворотке крови основной группы на всех этапах эксперимента не отличалось от такового в сыворотке крови животных группы контроля. Однако отмечена тенденция

Таблица

Концентрации АОА, ингибина В, АМН в сыворотке крови животных, Me (Q_1 – Q_4), %

Показатели	Основная группа					Контроль n=5
	5-е сут, n=5	10-е сут, n=6	15-е сут, n=6	30-е сут, n=7	60-е сут, n=6	
АОА (нг/мл)	1,55 (0,49–2,52)	1,18 (0–3,38)	1,28 (0,65–2,08)	10,29* (9,44–11,26)	14,07* (12,23–22,78)	1,19 (0,27–2,45)
Ингибин В (пг/мл)	70,59 (64,38–81,28)	61,51 (45,89–75,35)	66,87 (57,65–71,36)	58,93 (31,73–92,21)	237,96* (148,91–569,34)	73,01 (57,80–85,77)
АМН (нг/мл)	1,64 (1,45–1,85)	2,43 (1,64–2,89)	1,83 (1,32–1,96)	2,28 (1,49–3,04)	1,48 (1,29–2,78)	2,57 (2,0–2,73)

Примечание: * – $p < 0,05$ (p – критерий статистической значимости Манна–Уитни) по сравнению с контролем.

к его снижению на 60-е сутки. Данные кольпоцитологического исследования соответствовали стадии покоя эстрального цикла (диэструс).

Обсуждение

В наших исследованиях установлено, что окончательное формирование АО происходило к 30–60-м суткам эксперимента и сопровождалось нарушением синтеза ингибина В. Вместе с тем морфологические признаки АО появлялись уже на ранних сроках эксперимента.

Вызывает интерес факт повышения концентрации ингибина В к 60-м суткам. Принято считать, что концентрация ингибина В уменьшается при снижении овариального резерва в связи с уменьшением количества созревающих фолликулов и соответственно функционального гранулезного фолликулярного эпителия, способного синтезировать данный маркер [1, 3, 9]. В случае АО обнаруживается противоположная картина – концентрация ингибина В возрастает [9, 10, 12]. Высокий уровень ингибина В может свидетельствовать о том, что инфильтрации и дегенеративным изменениям при АО на начальных этапах развития подвергается тека – основной источник продукции предшественников эстрадиола в яичнике, тогда как неповрежденные клетки гранулы способны продуцировать ингибин В. Известно, что в условиях дефицита эстрадиола на фоне повышения фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) ингибин В, являясь антагонистом ФСГ, синтезируется в большем количестве [1, 10]. В нашем эксперименте к 60-м суткам значительно возрастал удельный объем первичных и вторичных фолликулов соответственно, и клеток гранулы, способных синтезировать ингибин В. Кроме того, также морфологически выявлены дегенеративные изменения текальной оболочки. Все это позволяет предположить, что формирование экспериментального АО сопровождалось селективным повреждением клеток теки.

Изменения концентрации АМН нами не установлены. Весьма вероятно, что это обусловлено достаточным количеством первичных и вторичных фолликулов с не поврежденным гранулезным слоем [3, 5].

Полученные нами данные подтверждают, что роль АМН и ингибина В в формировании овариального резерва до конца не определена [3, 5], поэтому необходимо дальнейшее исследование реакций АМН и ингибина В не только в эксперименте, но и в клинической практике.

Выводы

1. У животных окончательное формирование экспериментального аутоиммунного оофорита происходит к

30-м суткам после введения антигена, что подтверждается развитием характерных морфологических изменений в яичниках и высокой концентрацией АОА в сыворотке крови.

2. Увеличение концентрации ингибина В к 60-м суткам эксперимента сопровождается повышением удельного объема первичных и вторичных фолликулов.

Литература

1. Гузов И.И. Овариальный резерв и паракринный яичник [Электронный ресурс]. – М., 2009. – URL: <http://www.cironline.ru/guzov/presentation/Ovarian-reserve.pdf>. (дата обращения 15.05.2011).
2. Царегородцева М.В. Патогенетические аспекты формирования аутоиммунного оофорита при хронических воспалительных заболеваниях органов малого таза и его восстановительная терапия // АГ-инфо. – 2007. – № 2. – С. 32–36.
3. Broekmans F.J., Soules M.R., Fauser B.C. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences // Endocrine Reviews. – 2009. – Vol. 30, No 5. – P. 465–493.
4. Damjanovic M., Janovic B.D. Experimental autoimmune oophoritis. I. Inhibition of fertility in rats isoimmunized with homogenates of the ovary // Am. J. Reproduct. Immunol. – 1989. – Vol. 120. – P. 1–8.
5. Durlinger A.L.L., Visser J.A., Themmen A.P.N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone // Reproduction. – 2002. – No. 124. – P. 601–609.
6. Goswami D., Conway G.S. Premature ovarian failure // Human Reproduction Update. – 2005. – Vol. 11, No. 4. – P. 391–410.
7. Hoek A., Schoemaker J., Drexhage H.A. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity // Endocrine Reviews. – 1997. – Vol. 18, No. 1. – P. 107–134.
8. La Marca A., Brozzetti A., Sighinolfi G. et al. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes // Current Opinion in Obstetrics & Gynecology. – 2010. – Vol. 22, No. 4. – P. 277–282.
9. Soto N., Iniguez G., Lopez P. et al. Anti-Mullerian hormone and inhibin B levels as markers of premature ovarian aging and transition to menopause in type I diabetes mellitus // Human Reproduction. – 2009. – Vol. 24, No. 11. – P. 2838–2844.
10. Tsigkou A., Marzotti S., Borges L. et al. High serum inhibin concentration discriminates autoimmune oophoritis from other forms of primary ovarian insufficiency // J. Clin. Endocrinol. Metabol. – 2008. – Vol. 93, No. 4. – P. 1263–1269.
11. Shelling A.N. Premature ovarian failure // Reproduction. – 2010. – Vol. 140, No. 5. – P. 633–641.
12. Welt C.K., Falorni A., Taylor A.E. et al. Selective theca cell dysfunction in autoimmune oophoritis results in multifollicular development, decreased estradiol, and elevated inhibin B levels // J. Clin. Endocrinol. Metabol. – 2005. – Vol. 90, No. 5. – P. 3069–3075.

Поступила 29.11.2011