

УДК 616.43.8-092.19:577.1] -092.9

О. Г. Резніков
Н. Д. Носенко
П. В. Сініцин
Л. В. Тарасенко
А. А. Лимарєва
Л. І. Полякова

*ПОРУШЕННЯ НЕЙРОЕНДОКРИННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ СИСТЕМ РЕПРОДУКЦІЇ ТА АДАПТАЦІЇ У САМИЦЬ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРАНДРОГЕНІЇ

ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України", м. Київ

Ключові слова: гіперандрогенія, статеві поведінка, репродукція, адаптація, препубертатний та постпубертатний періоди.

Резюме. Андроєнізація самиць щурів (підшкірна імплантація капсул, що містять кристалічний тестостерон) у препубертатному або постпубертатному періоді призводить до розвитку ановуляторного стану, що характеризується порушенням або припиненням естральних циклів, викликає патологічні зміни гістологічної будови яєчників і помірне підвищення в них ароматазної активності. В андроєнізованих тварин відмічена маскулінізація статевої поведінки, а також послаблення адренкортикальної реакції на стресову стимуляцію та її пролонгована відповідь на введення норадреналіну у третій шлуночок мозку. Визначення провідної ролі гіперандрогенії в патогенезі нейроендокринних порушень може мати суттєве значення для цілеспрямованого пошуку і розробки засобів запобігання та корекції цих розладів.

Вступ

Гормональна дисрегуляція спричинює розвиток цілої низки захворювань і патологічних станів у жіночому організмі. Одною з найбільш поширеною причиною цих розладів вважають гіперандрогенію. Більшість досліджень присвячені вивченню віддалених наслідків впливу надлишку екзогенних андрогенів у пре- та ранньому постнатальному періодах індивідуального розвитку організму. Показано, що ці порушення характеризуються патологічними змінами в нейроендокринній регуляції секреції гонадотропних гормонів, статевої поведінки, а також розладами метаболічних та адаптаційних процесів [2, 3, 5, 8, 11]. Значно менше відомо про розвиток нейроендокринних порушень у самиць щурів за умов гіперандрогенії в більш віддалені періоди життя.

Мета дослідження

Дослідити особливості метаболічного перетворення тестостерону, статевої поведінки, а також реакції адренкортикальної ланки ГГАС на центральну норадренергічну та стресову стимуляцію в самиць щурів, які зазнавали дії надлишку андрогенів у препубертатний та постпубертатний періоди.

Матеріал і методи

Дослідження проведено на 79 самицях щурів лінії Вістар віком 3, 6 та 8 міс. Тварин утримували на звичайному раціоні в стандартних умовах віварію. Всі експерименти виконані з дотриман-

ням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей.

Моделювання гіперандрогенного стану в самиць щурів здійснювали за допомогою імплантації силастикових капсул, що містили 5 мг кристалічного тестостерону ("Fluka", Нідерланди). Детально методика описана нами раніше [4]. Капсули з тестостероном імплантували тваринам у препубертатному (35 днів) або статевозрілому віці (5 міс). Через 3 тижні після імплантації капсул вивчали фазову структуру естральних циклів шляхом щоденного цитологічного аналізу вагінальних мазків за допомогою світлової мікроскопії. В експериментах використовували лише тварин з порушеними естральними циклами. Контрольні групи формували з інтактних самиць відповідного віку, з регулярними естральними циклами.

Активність ферментів ароматазного комплексу і 5 α -редуктази у тканинах яєчників самиць щурів віком 3 міс вивчали за модифікованим методом MacLusky із співавт. [12], який полягає у розділенні у тонкому шарі силікагелю та наступній радіометрії продуктів реакції, що утворилися внаслідок інкубування надосадової фракції (після центрифугування при 1000 об/хв) 10% гомогенату тканини з [1,2,6,7-³H] тестостероном. Ароматазну та 5 α -редуктазну активності виражали в одиницях активності (Од), що дорівнюють мкмоль естрадіолу або 5 α -відновлених метаболітів тестостерону (сумі 5 α -дигідротестостеро-

ну та 5 α -андростан-3 α ,17 β -діолу), відповідно, утворених протягом 1 год інкубування у перерахунку на г сірої тканини.

Статеву поведінку у самиць щурів віком 3 міс вивчали за загальноприйнятою методикою [13]. Дослідження статевої поведінки за жіночим типом проводили на оварієктомованих за тиждень до експерименту тваринах, у яких викликали штучний еструс введенням естрадіолу бензоату (0,1 мг на тварину внутрішньом'язово) за 48 год та прогестерону (0,5 мг на тварину внутрішньом'язово) за 4-5 год до тестування. Дослідження проводили в темній кімнаті при слабкому червоному світлі на щурах, що перебували в темряві до моменту тестування протягом не менше 4-5 год. Самця поміщали в клітку за 5 хв до тестування для його адаптації до умов дослідження. До кожного самця підсаджували досліджувану самицю, яка знаходилася в клітці впродовж 10 хв або до 10 садок самця. Реєстрували ознаки процептивної поведінки (наближення, обнюхування статевих органів, підстрибування, покусування вух) та рецептивну поведінку (кількість лордозних реакцій). Обчислювали лордозний коефіцієнт, тобто відсоток лордозних реакцій відносно загальної кількості садок самця. Для тестування статевої поведінки за чоловічим типом до піддослідної самиці підсаджували на 10 хв рецептивно активну інтактну самицю в стадії еструсу. Спостерігали за наближенням тварини до рецептивної самиці, обнюхування нею статевих органів (чоловіча процептивна поведінка), а також реєстрували кількість садок (чоловіча копулятивна поведінка).

Стресову реактивність ГГАС вивчали у самиць щурів віком 6 міс. Оцінювали гормональну реакцію кори надниркових залоз на гострий тест-стрес (імобілізація протягом 1 год). Знеживлення тварин проводили під слабким ефірним наркозом до та відразу ж після закінчення імобілізації.

Для вивчення норадренергічної реактивності ГГАС за 8 діб до експерименту тваринам віком 8 міс, що перебували під хлоралгідратним наркозом, під стереотаксичним контролем у третій шлуночок мозку було імплантовано сталеву спрямовуючу канюлю з мандреном [6]. За 24 год до експерименту у праву зовнішню яремну вену під легким ефірним наркозом було введено силастиковий катетер [10]. За 1 год до початку експерименту катетер було подовжено поліетиленовою трубкою, заповненою розчином гепарину (50 Од/мл 0,9 % розчину хлориду натрію). Мандрен заміняли внутрішньою канюлею, що була попередньо заповнена розчином норадреналіну бітартрату (Koch Light Labs, Англія). Інфузію норадреналіну (10 мкг у 2 мкл 0,9% апірогенного розчину

хлориду натрію) проводили протягом 1 хв. Зразки крові для визначення вмісту кортикостерону відбирали із катетера до та через 30, 60 і 90 хв після інфузії норадреналіну.

Вміст кортикостерону в плазмі крові визначали флюориметричним мікрометодом [1], тестостерону - радіоімунологічним методом з використанням наборів "RIA Testosterone direct" фірми "Immunotech" (Франція). Радіоактивність зразків вимірювали на гамма-лічильнику 5500-B ("Beckman", США).

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стьюдента і непараметричного U- критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Обговорення результатів дослідження

Гіперандрогенний стан у щурів з імплантованими капсулами з тестостероном підтверджено результатами вимірювання вмісту тестостерону в плазмі крові. У самиць, андрогенізованих у препубертатному періоді, рівень тестостерону зростав майже утричі, а у тварин, підданих дії надлишку андрогенів у постпубертатний період, - більше ніж у 5 разів порівняно з нормою (рис. 1).

У 83, 3% андрогенізованих самиць, яким імплантували капсули з тестостероном у препубертатному віці, спостерігалось порушення морфогенезу вагінального епітелію, внаслідок чого відкриття піхви у цих тварин ($57,8 \pm 0,7$ доба) відбувалося в середньому на 11,7 діб пізніше, ніж в контролі ($46,1 \pm 3,1$ доба) ($P < 0,001$). Оскільки за фізіологічних умов процес статевого дозрівання

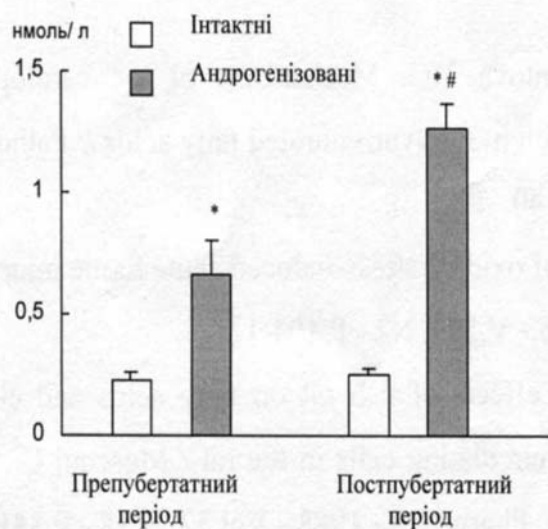


Рис. 1. Вміст тестостерону в плазмі крові самиць щурів, андрогенізованих у препубертатному або постпубертатному періоді. * $P < 0,05$ - порівняно з інтактними самицями відповідної групи; # $P < 0,05$ порівняно з самицями, андрогенізованими у препубертатний період

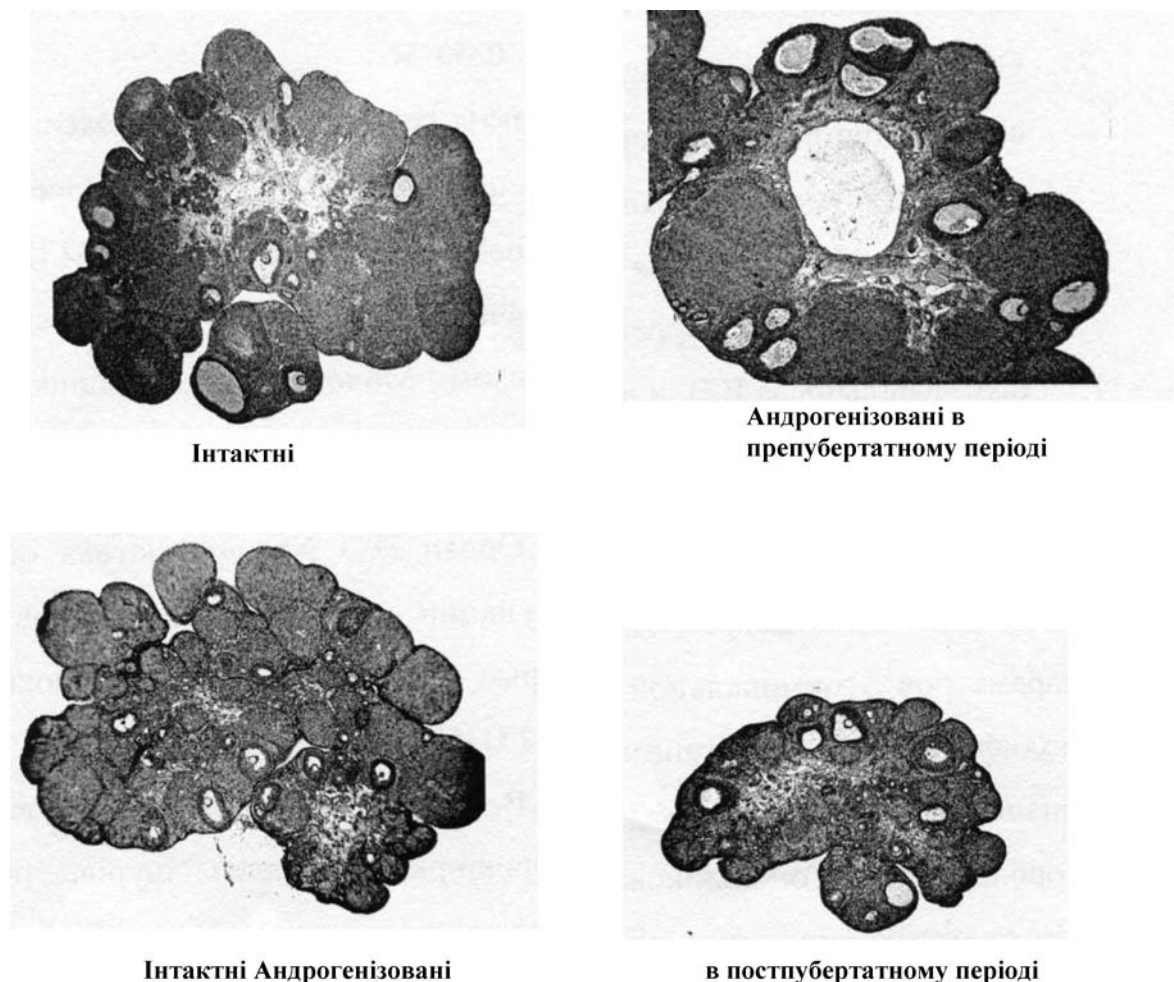


Рис. 2. Морфологічна будова яєчників щурів.

А - яєчники самиць щурів віком 3 міс. Б - яєчники самиць щурів віком 6 міс. Гематоксилін-еозин, об. 4.

контролюється естрогенами, синтез яких в організмі наприкінці пубертації значно зростає, можна дійти висновку, що порушення морфогенезу вагінального епітелію відбувається завдяки антагоністичній дії тестостерону по відношенню до ендогенних естрогенів.

У переважної більшості тварин з експериментальною гіперандрогенією спостерігалися порушення статевої циклічності, які, залежно від терміну імплантації капсул з тестостероном - у препубертатному або статевозрілому віці, характеризувалися нерегулярними естральними циклами із подовженою стадією дієструсу (у 66,7 % самиць) або їх повним перериванням і розвитком персистентного дієструсу (у 64,3 % самиць) відповідно.

Зміни стану естральних циклів певною мірою узгоджувались і з результатами морфологічного дослідження яєчників. Так, в групі андрогенізованих у препубертатному віці тварин з нерегулярними циклами спостерігалася помітна тенденція до зниження маси яєчників ($39,9 \pm 2,6$ мг/100 г м.т.) у порівнянні з контролем ($43,5 \pm 1,7$ мг/100 г м.т.,

$0,05 < P < 0,1$). В яєчниках значно зменшувалось утворення жовтих тіл, спостерігалися порушення фолікулогенезу, дегенеративні зміни фолікулярного епітелію, що посилювало атрезію фолікулів, дрібнокістозне або кістозне їх переродження (рис. 2, А). Крім того в яєчниках тварин цієї дослідної групи знайдено незначне, але вірогідне підвищення ароматазної активності ($12,61 \pm 0,31 \times 10^{-8}$ Од/г) у порівнянні з інтактними тваринами ($11,39 \pm 0,31 \times 10^{-8}$ Од/г, $P < 0,05$), що може бути зумовлено підвищенням рівня субстрату ароматази, тобто тестостерону, в крові андрогенізованих самиць. Вірогідних змін 5 α -редуктазної активності в яєчниках не виявлено.

В андрогенізованих у статевозрілому віці самиць щурів, у яких естральні цикли припинялись і розвивався стан персистентного дієструсу, зазначені порушення мали більш виражений характер. Маса яєчників зменшувалась до $15,1 \pm 1,3$ мг/100 г м.т., тобто утричі, порівняно з контролем ($46,0 \pm 2,4$ мг/100 г м.т., $P < 0,001$). Морфологічним проявом цих змін були повна відсутність

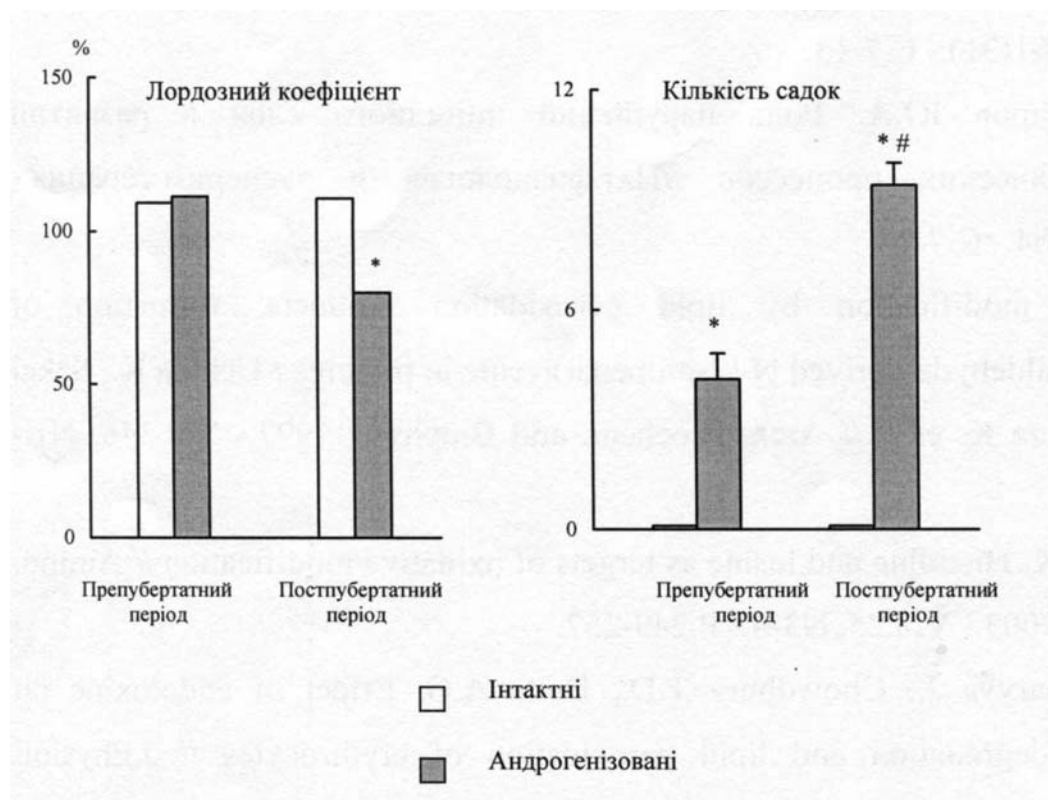


Рис. 3. Лордозний коефіцієнт та кількість садок у самиць щурів, андрогенізованих у препубертатному або постпубертатному періоді. $P < 0,05$ - порівняно з інтактними самицями відповідної групи; $^{\#}P < 0,05$ порівняно з самицями, андрогенізованими в препубертатний період

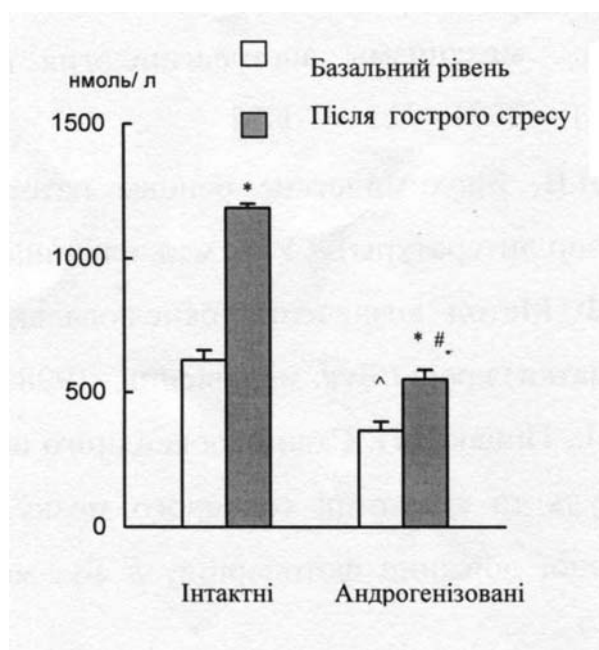


Рис. 4. Вміст кортикостерону в плазмі крові самиць щурів, андрогенізованих у статевозрілому віці, до та після гострого стресу. $P < 0,05$ - вірогідність різниці порівняно з базальним рівнем гормону у тварин відповідної групи; $P < 0,05$ - вірогідність різниці порівняно з базальним рівнем гормону в інтактних тварин; $^{\#}P < 0,05$ - вірогідність різниці порівняно з післястресовим рівнем гормону в інтактних тварин

жовтих тіл в яєчниках, порушення фолікулогенезу, атрезія фолікулів і кістозні зміни (рис. 2, Б).

Дослідження статевої поведінки показало, що у самиць щурів віком 3 міс з нерегулярними естральними циклами, які зазнавали дії надлишку андрогенів у препубертатному віці, значення показників тестування статевої поведінки за жіночим типом практично не змінювалися. Всі вони демонстрували активну процептивну і рецептивну поведінку. Лордозний коефіцієнт - основний показник рецептивної поведінки самиць, не відрізнявся від контролю (рис. 3). Водночас у дослідних тварин істотно змінювалась гетеротипова статева поведінка. З'являлися компоненти чоловічої статевої поведінки, а саме - садки, які характерні для самців і повністю відсутні у нормальних самиць, що вказує на маскулінізувальний ефект гіперандрогенії в препубертатний період (рис. 3).

Більш значні порушення статевої поведінки продемонстровано в андрогенізованих у статевозрілому віці самиць щурів. У тварин віком 6 міс, які перебували в стадії персистентного дієструсу, спостерігалось значне послаблення жіночої статевої поведінки, про що свідчить вірогідне зменшення на 30,8 % лордозного коефіцієнта порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 3). Зміни статевої поведінки за чоловічим типом у

самиць цієї дослідної групи за своєю спрямованістю були однаковими з такими у тварин за умов гіперандрогенії у препубертатний період, при цьому ступінь їх прояву був виразнішим, про що свідчить збільшення у 2,3 раза кількості садок (рис. 3). Отже, гіперандрогенія у статевозрілих самиць спричиняла як маскулінізацію, так і дефемінізацію статевої поведінки. Цілком очевидно, що ступінь порушення статевої поведінки в андрогенізованих тварин залежить від рівня андрогенної насиченості організму, який, як показали наші гормональні дослідження, значно вищий у самиць, що зазнавали дії надлишку андрогенів у статевозрілому віці (рис. 1).

У самиць щурів, підданих дії надлишку андрогенів у статевозрілому віці, виявлено певні зміни стресової та норадренергічної реактивності ГГАС. Зокрема було показано, що у дослідних тварин віком 6 міс, які перебували в стадії персистентного дієструсу щонайменше 10 діб, має місце послаблення реакції кори надниркових залоз на гострий стрес на тлі вірогідного зниження базального та індукованого гострим стресом рівня кортикостерону в плазмі крові (рис. 4). Як відомо, в нормі у самиць щурів стресова реакція ГГАС формується під впливом стимулювальної дії естрогенів на секрецію АКТГ [7, 14]. З огляду на те, що у статевозрілих самиць з гіперандрогенною ановуляцією гальмується фолікулогенез та посилюються дегенеративні зміни фолікулярного епітелію (рис. 2, Б), можна припустити, що за цих умов клітини фолікулярного епітелію втрачають здатність до біосинтезу естрогенів на нормальному рівні, а отже послаблюється їх стимулювальний вплив на стресову відповідь ГГАС. Крім того, не можна виключити ймовірність прямої гальмівної дії андрогенів на функцію ГГАС [9].

При дослідженні норадренергічної реактивності ГГАС встановлено, що у контрольних самиць у відповідь на введення норадреналіну у третій шлуночок мозку на 30-й хв достовірно підвищується рівень кортикостерону в плазмі крові, який поступово, починаючи з 60-ої хв, повертається до нормального (рис. 5). В андрогенізованих самиць віком 8 міс, які перебували в стадії персистентного дієструсу, реакція кори надниркових залоз на центральну норадренергічну

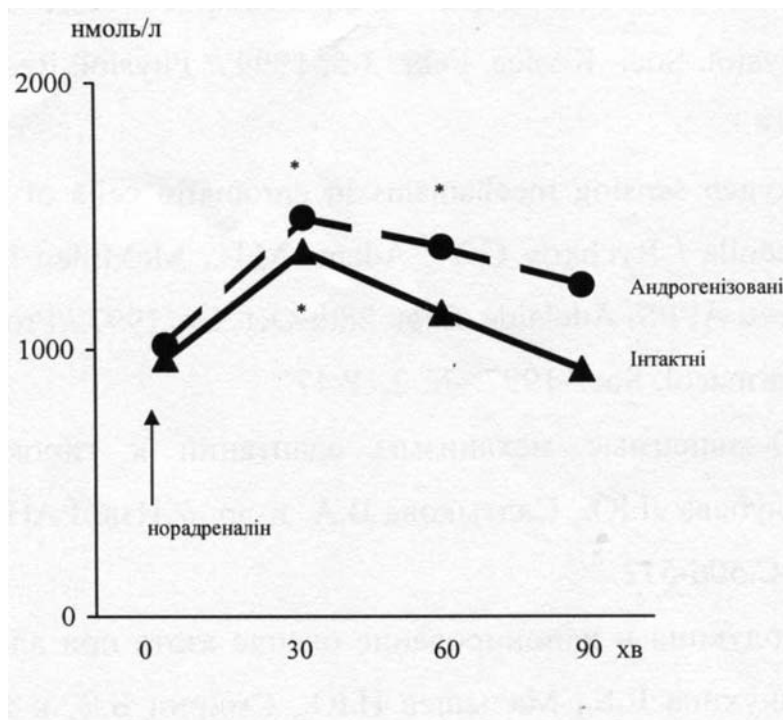


Рис. 5. Вплив введення норадреналіну в третій шлуночок мозку на вміст кортикостерону в плазмі крові самиць щурів, андрогенізованих у статевозрілому віці. $P < 0,05$ - вірогідність різниці порівняно з вихідним рівнем гормону

стимуляцію була дещо подовжена у часі (повернення рівня гормону до базального відбувалось на 90-й хв). При цьому амплітуда адренокортикальної реакції ГГАС, що визначається приростом рівня кортикостерону - в плазмі крові у відповідь на норадренергічну стимуляцію гіпоталамуса відносно вихідного рівня, в андрогенізованих самиць була підвищеною впродовж всього терміну спостереження. Цілком ймовірно, що зміни адренокортикальної реакції на центральну норадренергічну стимуляцію в андрогенізованих у статевозрілому віці тварин можуть бути спричинені нечутливістю центрів регуляції ГГАС до гальмівного впливу надлишку циркулюючих андрогенів. Натомість з'ясування генезу цього явища потребує спеціальних досліджень.

Висновки

1. Андрогенізація самиць щурів у препубертатному або статевозрілому віці призводить до розвитку ановуляторного стану, що характеризується порушенням або припиненням естральних циклів, викликає патологічні зміни гістологічної будови яєчників і помірне підвищення в них ароматазної активності, а також спричинює маскулінізацію та/або дефемінізацію статевої поведінки.

2. У самиць щурів, підданих дії надлишку андрогенів у статевозрілому віці, виявлено зміни стресової та норадренергічної реактивності

ГГАС: послаблення адренокортикальної реакції на стресову стимуляцію та її пролонгована відповідь на введення норадреналіну у третій шлуночок мозку.

Перспективи подальших досліджень

Визначення провідної ролі гіперандрогенії в патогенезі порушень метаболічних процесів, статевих поведінки, репродуктивної функції та реактивності ГГАС у віддалені періоди індивідуального розвитку організму може мати суттєве значення для цілеспрямованого пошуку і розробки засобів запобігання та корекції цих розладів.

Література. 1. Балашов Ю. Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостерона: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. - 1990. - Т. 76, № 2. - С. 280-283. 2. Резніков О.Т. Механізми розвитку функціональної патології репродукції та адаптації в ранньому онтогенезі // Журн. АМН України. - 1998. - № 2. - С. 216-233. 3. Резніков О.Т., Носенко Н.Д., Сініцин П.В. Кальційзалежні механізми порушень стресової та норадренергічної реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи у неонатально андрогенізованих самиць шурів // Физиол. журн. - 2008. - Т. 54, № 6. - С. 24-29. 4. Резніков О.Т., Сініцин П.В., Тарасенко Л.В., Полякова Л.І. Нейроендокринні механізми розвитку ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження у шурів // Физиол. журн. - 1995. - 41, №5-6. - С. 33-37. 5. Тарасенко Л.В. Роль внутрішньоклітинних іонів кальцію у формуванні статевої поведінки у неонатально андрогенізованих самиць шурів // Ендокринологія. - 2009. - Т. 14, № 1. - С. 152-156. 6. Antunes-Rodrigues J. Chemical stimulation of water, sodium chloride and food intake by injection of cholinergic and adrenergic drugs into the third brain ventricle // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1970. - Vol. 133. - P. 1464-1470. 7. Burgess L.H., Handa L.H. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats // Endocrinology. - 1992. - Vol. 131. - P. 1261-1269. 8. Foecking E.M., McDevitt M.A., Acosta-Marthnez M., Horton T.H., Levine J.E. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents // Horm. Behav. - 2008. - Vol. 53, №5. - P. 673-692. 9. Hani A., Dalle M., Delost P. Role of testosterone in the sexual dimorphism of adrenal activity at puberty in the guinea-pig // J. Endocrinol. - 1980. - Vol. 87, № 3. - P. 455-461. 10. Harms P. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein // J. Appl. Physiol. - 1974. - Vol. 36. - P. 391-392. 11. Hoepfner B.A., Ward I.L. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats // Behav. Neurosci. - 1988. - Vol. 102. - P. 61-65. 12. MacLusky N.D., Philip A., Hulburt C., Naftolin F. Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early postnatal life // Psychoneuroendocrinology. - 1985. - Vol. 77, № 3. - P. 355-361. 13. Rodriguez-Medina M., Canchola E., Vergara-Onofre M., Rosado A. Ca²⁺/calmodulin system: Participation on sexual hypothalamic differentiation // Pharmacol. Biochem. Behav. - 1993. - Vol. 46. - P. 697-702. 14. Vamvakopoulos N.C., Chrousos G.P. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression:

potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction // J. Clin. Invest. - 1993. - Vol. 92. - P. 1896-1902.

НАРУШЕНИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМ РЕПРОДУКЦИИ И АДАПТАЦИИ У САМОК КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРАНДРОГЕНИИ

А. Г. Резникову Н.Д. Носенко, П.В. Сініцын, Л.В. Тарасенко, А.А. Лимарева, Л.І. Полякова

Резюме. Андрогенизация самок крыс (подкожная имплантация капсул, содержащих кристаллический тестостерон) в препубертатном или постпубертатном периоде, приводит к развиту ановуляторного состояния, характеризующегося нарушением или прекращением эстральных циклов, вызывает патологические изменения в гистологическом строении яичников и умеренное повышение в них ароматазной активности. У андрогенизированных животных отмечена маскулинизация полового поведения, а также ослабление аденокортикальной реакции на стрессорную стимуляцию и ее пролонгированный ответ на введение норадреналина в третий желудочек мозга. Установление ведущей роли гиперандрогении в патогенезе нейроэндокринных нарушений может иметь существенное значение для целенаправленного поиска и разработки средств предупреждения и коррекции этих расстройств.

Ключевые слова: гиперандрогения, половое поведение, репродукция, адаптация, препубертатный и постпубертатный периоды.

DISTURBANCES IN NEUROENDOCRINE REGULATION OF REPRODUCTION AND ADAPTATION SYSTEMS IN FEMALE RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERANDROGENICITY

A. G. Reznikov, N. D. Nosenko, P. V. Sinityn, L. V. Tarasenko, A.A. Lymareva, L.I. Poliukova

Abstract. Androgenization of pre- or postpubertal female rats (subcutaneous implantation of testosterone filled capsules) gives rise to anovulation, characterized by disturbances of estrous cyclicity or its discontinuation, provokes pathological changes in ovarian histology and mild increase of aromatase activity. The masculinization of sexual behavior was observed as well as a decrease of adrenocortical response to stress stimulation and prolonged reaction to noradrenaline infusion into the third brain ventricle. The evaluation of leading role of hyperandrogenicity in the pathogenesis of neuroendocrine disorders may be of importance for the search and development of the methods of prevention and therapy of those disorders.

Key words: hyperandrogenicity, sexual behavior, reproduction, adaptation, pre- and postpubertal periods.

S.E. Institute of Endocrinology and Metabolism named after V.P. Komisarenko NAMH of Ukraine (Kyiv)

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol. 12, №2 (44). - P. 3-8.

Надійшла до редакції 17.05.2013

© О. Г. Резніков, Н. Д. Носенко, П. В. Сініцин, Л. В. Тарасенко, А. А. Лимарева, Л. І. Полякова, 2013