

DOI: 10.26693/jmbs02.04.020

УДК 616-001.18-092.9: 577.175.5

Кузьмина И. Ю.<sup>1</sup>, Жуликова М. В.<sup>1</sup>, Божок Г. А.<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ОБЩЕГО ОХЛАЖДЕНИЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЯИЧНИКОВ И БУРОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

<sup>1</sup>Харьковский национальный медицинский университет

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

irina.u.kuzmina@gmail.com

Для изучения влияния общего охлаждения на морфометрические показатели яичников и бурой жировой ткани, проведены исследования на 40 белых самках крысах 4 недельного возраста линии Vistar, массой 30-40г, которые были разделены на 5 групп: 1-я - 8 крыс, которые подвергались постоянному холодовому воздействию (ПХВ); 2-я – 8 крыс, которым на фоне ПХВ проводили введение дегидроэпиандростендиола-сульфат (ДГА- сульфат), растворенного в 0,2 мл очищенного и стерилизованного оливкового масла; 3-я – 8 крыс, которым вызывали экспериментальный СПКЯ введением только ДГА- сульфата, без ПХВ; 4-я группа – 8 животных, которым вводили только оливковое масло без ДГА- сульфата и ПХВ; 5-я – 8 крыс, которым ничего не вводили - интактный контроль и не подвергали воздействию ПХВ. Установлено, что введение ДГА- сульфата 4-недельным самкам крыс на протяжении 25 суток приводит к возникновению кист в яичниках. Происходит активация БЖТ у крыс, подвергнутых ПХВ (при +4°C в течение 4 ч) на протяжении 25 суток. ПХВ на фоне введения ДГА- сульфата препятствует развитию кистозных изменений в яичниках крыс.

**Ключевые слова:** морфометрия, яичники, бурая жировая ткань, постоянное холодное воздействие.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Работа является частью исследований, проводимых на кафедре патологической физиологии им. Д.Е. Альперна Харьковского национального медицинского университета (ХНМУ) по Государственной комплексной программе "Патогенез повреждающего действия на организм экзогенных факторов в современных условиях", № гос. регистрации 0115U000991.

**Введение.** Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) заключается в овариальной дисфункции (нерегулярные месячные, ановуляция), связанной гиперандрогенией (ГА) и «поликистозной» морфо-

логией яичников. Этиологическими факторами данного заболевания, по мнению некоторых ученых, является нарушение гормональной регуляции, которая обусловлена первичной патологией гипофиза, гипоталамуса, коры надпочечников и приводит к избыточной продукции лютеинизирующего гормона (ЛГ) и андрогенов [1].

Одним из возможных факторов патогенеза СПКЯ в настоящее время называют нарушение функции жировой ткани, связанное с резистентностью к инсулину вызванного экзогенным введением дегидроэпиандростендиола-сульфат (ДГА-сульфат) [2].

**Целью исследования** явилось изучить морфометрические показатели яичников крыс на фоне постоянных холодных воздействий (ПХВ) и экспериментального моделирования СПКЯ на фоне введения ДГА- сульфата.

**Объект и методы исследования.** Эксперименты на животных проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г., Киев, Украина) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Исследования проведены на 40 белых самках крысах 4 недельного возраста линии Vistar 27-дневного возраста, массой 30-40, которые были разделены на 5 групп: 1-я - 8 крыс, которые подвергались ПХВ; 2-я – 8 крыс, которым на фоне ПХВ проводили введение ДГА- сульфата, растворенного в 0,2 мл очищенного и стерилизованного оливкового масла; 3-я – 8 крыс, которым вызывали экспериментальный СПКЯ введением только ДГА- сульфата, без ПХВ; 4-я группа – 8 животных, которым вводили только оливковое масло без ДГА- сульфата и ПХВ; 5-я -8 крыс, которым ничего не вводили - интактный контроль и не подвергали воздействию ПХВ. Животные всех групп получали одинаковый рацион.

ПХВ здійснювали путем выдерживания животных в течение 4 часов в камере, в которой поддерживались световой режим и температура +4°C. Оставшиеся 20 ч животные находились при нормальных условиях температуры окружающей среды и светового режима. Крыс охлаждали ежедневно в течение 25 дней.

Крысам 2 и 3 групп моделировали поликистозный процесс в яичниках путем подкожного введения 8 мг / 100 г массы тела масляного раствора ДГА- сульфат, ежедневно, в течение 25 суток [2].

На 26 сутки животных забивали, забирали яичники и бурюю жировую ткань (БЖТ) из межлопаточной области. Органы фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФА, Sigma) в течение 4 ч, после чего переносили на 12 часов в 25% раствор сахарозы на фосфатно-солевом буфере (PBS). Замораживали органы в монтирующей среде Tissue-Tek («Sakura», Япония) и до приготовления криостатных срезов хранили в жидком азоте.

Гистологическому исследованию подвергались БЖТ и яичники экспериментальных животных. Для приготовления криостатных срезов органы извлекали из низкотемпературного хранилища и изготавливали срезы ткани толщиной 5 мкм на криомикротоме MEV (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Микрофотосъемку производили с помощью светооптического микроскопа с цифровой камерой Amscope IN300T (Китай). Морфометрический анализ фотографий серийных срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, осуществляли с помощью программы для обработки изображений AxioVision Rel 4.7.

Подсчитывали количество адипоцитов БЖТ разных типов. Адипоциты разделили на 3 типа: А1 – содержащие одну большую липидную каплю; А2 – содержащие одну большую и несколько мелких липидных капель; А3 – содержащие множество мелких липидных капель. Подсчитывали 100 адипоцитов в разных срезах. Количество клеток каждого типа выражали в процентах от общего числа подсчитанных адипоцитов. В определение морфологических показателей яичников входили: среднее количество фолликулов разных типов, кист и желтых тел. Подсчеты производили на 15 срезах ткани яичников, полученных от каждого из экспериментальных животных. Показатели нормировали на 1 срез ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Excel» и «Stasticca 10». Проверяли данные на нормальность распределения с помощью теста Колмогорова и Смирнова, использовали однофакторный дисперсионный

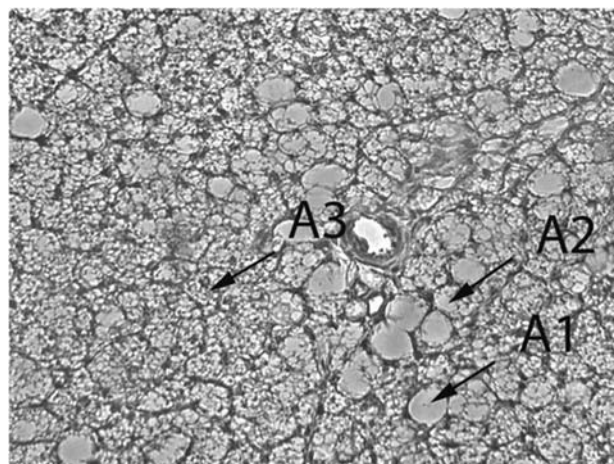
анализ для сравнения двух выборок, достоверными считались различия при  $p < 0,05$ . Количественные данные представляли в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение.

**Результаты исследований и их обсуждение.**

БЖТ состоит из специализированных адипоцитов, отличающихся от адипоцитов белой жировой ткани. Клетки БЖТ имеют средних размеров нормохромное ядро с несколькими ядрышками, обычно расположенное по центру. Ядро окружено жировыми каплями, хорошо отграниченными друг от друга. За счет этого клетки выглядят «многокамерными» (рис. 1). Изредка присутствуют клетки с одной крупной жировой вакуолью и смещенным к мембране ядром. Эти клетки мы обозначали как адипоцит 1 типа (А1). Также встречаются адипоциты, имеющие крупную жировую вакуоль, окруженную несколькими мелкими (адипоциты 2 типа, А2). Клетки, которые содержат множество мелких жировых капель в цитоплазме, мы обозначали как адипоциты 3 типа (А3).

БЖТ имеет бурый цвет за счет обильной васкуляризации и наличия в клетках множества митохондрий, содержащих цитохромы.

Ежедневное помещение крыс в условия общего охлаждения (4 ч при +4°C) приводило к изменению цитоморфологических характеристик БЖТ. В группе 1 (ПХВ) наблюдалось уменьшение количества адипоцитов 1 и 2 типа по сравнению с интактной тканью. Визуально, ткань приобретала более плотную упаковку и выраженный буро-коричневый цвет.

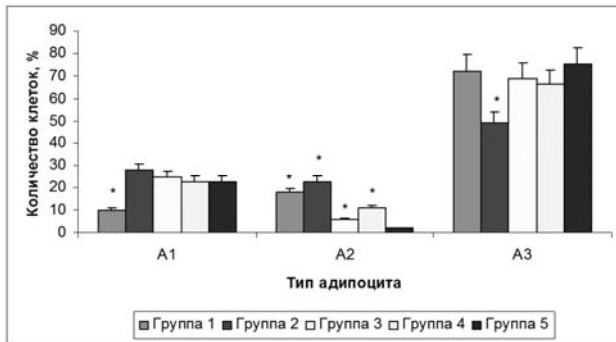


**Рис. 1.** БЖТ крысы из группы 5 (интактный контроль).

Обозначения адипоцитов:

А1 – содержащий одну большую липидную каплю; А2 – содержащий одну большую и несколько мелких липидных капель; А3 – содержащий множество мелких липидных капель. Окраска: гематоксилин и эозин.

Ув. x200



**Рис. 2.** Кількість адипоцитів різних типів в БЖТ крис. Кількість кліток кожного типу виражали в процентах від загального числа підрахованих адипоцитів.

**Примечание:** \* – различия достоверны по отношению к интактному контролю,  $p < 0,05$

У животных 2 группы, которым проводили введение ДГА- сульфата в условиях общего охлаждения, наблюдались признаки, характерные для интактной ткани: сохранялись клетки с крупными жировыми вакуолями. При этом участки с плотно упакованными адипоцитами с мелкими жировыми включениями (A1) перемежались зонами, представленными адипоцитами 1 и 2 типа.

На фоне введения ДГА- сульфата без ПХВ (3 группа) в БЖТ сохранялись основные морфологические признаки, характерные для 4 и 5 группы животных.

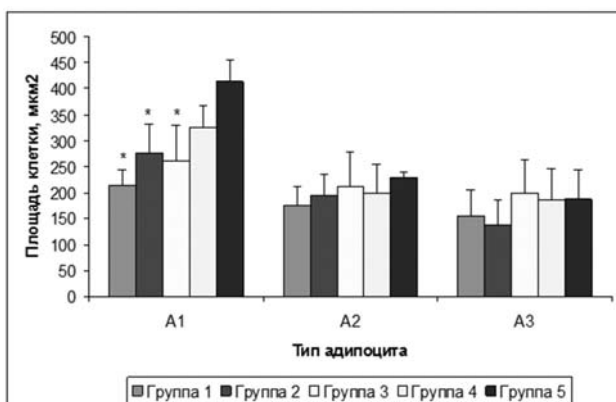
Морфометрический анализ позволил провести количественную оценку изменений цитоморфологического профиля БЖТ при использованных воздействиях. Установлено достоверное уменьшение количества клеток A1 типа в БЖТ животных с ПХВ (1 группа) и клеток A3 в БЖТ животных с ПХВ+ ДГА- сульфат (2 группа) по сравнению с интактным контролем (**рис. 2**).

Интересная особенность наблюдалась в отношении изменения количества клеток типа A2. Во всех 4 экспериментальных группах количество данных адипоцитов было достоверно выше значений интактного контроля. Определенные нами клетки A2 как адипоциты с одной крупной жировой вакуолью и несколькими мелкими, по-видимому, являются «переходным» типом между A1 – запасными адипоцитами и A3 – функционально-активными адипоцитами. Увеличение количества таких клеток, возможно, отражает состояние функциональной нагрузки на БЖТ в условиях применения внешних воздействий (охлаждение, стресс от инъекции ДГА- сульфата или оливкового масла).

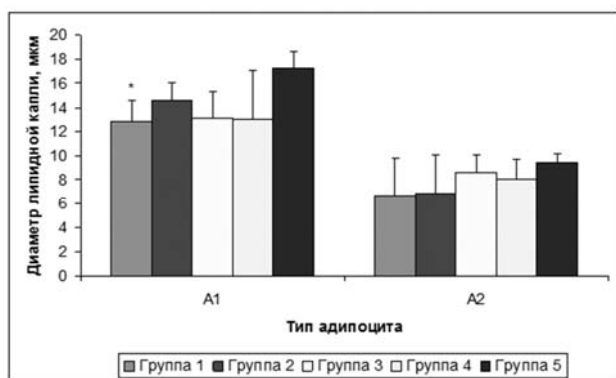
Изменения происходили не только в количественном соотношении типов адипоцитов, но и в показателях площади и диаметра липидных капель (**рис. 3, а; б**).

Установлено достоверное уменьшение площади адипоцитов A1 после применения ПХВ и введения ДГА- сульфата (группы 1, 2 и 3). В адипоцитах этого же типа наблюдалось достоверное уменьшение диаметра липидных вакуолей в группе животных, подвергнутых ПХВ.

Обобщая результаты, можно отметить, что под воздействием холода в БЖТ животных происходят адаптивные реакции, направленные на мобилизацию липидных запасов для генерации тепла. Это выражается в уменьшении количества клеток с большими липидными каплями (A1), появлении клеток с многокамерной структурой (A2), уменьшении площади клеток и диаметра липидных капель в них. Полученные нами результаты совпадают с данными других авторов, которые наблюдали сходные морфологические изменения БЖТ у крыс при долгосрочных холодных воздействиях [3]. При введении ДГА- сульфата наблюдаются изме-



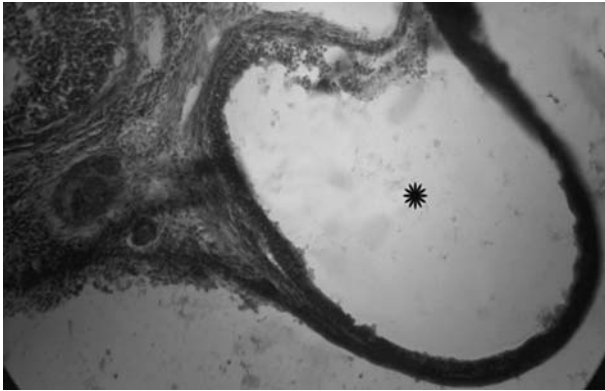
А



Б

**Рис. 3.** Площадь адипоцитов разных типов (А) и диаметр липидных капель (Б).

**Примечание:** \* – различия достоверны по отношению к интактному контролю,  $p < 0,05$



**Рис. 4.** Репрезентативна фотографія кисти яєчника у крыси 3 групи.  
\* – кистозна порожнина. Офарбування: гематоксилін і еозин. Ув. x40

нення, які так само можна охарактеризувати як активацію БЖТ. Раніше було показано участь ДГА- сульфата в ряду метаболічних шляхів, затрагиваючих ліпідний і вуглеводний обмін. Крім того, доведено підвищення вмісту мітохондріальних білків в БЖТ під дією даного гормону.

Нами була вибрана модель, яка поєднує введення ДГА- сульфата і активацію БЖТ природним способом – холодним впливом. Наявність кист в яєчниках тварин (**рис. 4**) спостерігалась в єдиній групі – з введенням ДГА- сульфата (група 3).

Кількісні морфометричні показники яєчників крыс експериментальних і інтактної групи представлені в **таблиці**.

Установлено, що в групах з введенням ДГА- сульфата (групи 2 і 3) спостерігалось збільшення кількості преантральних і антральних фолликулів. 3-я група (ДГЭА без охолодження) також характеризувалась підвищеним кількістю атретических фолликулів.

Наші результати збігаються з отриманими раніше даними про стимуляцію андрогенами росту вторинних фолликулів [4]. Наприклад, в культурі

*in vitro* обробка преантральних фолликулів андрогенами стимулювала їх ріст [5].

Незважаючи на те, що в групі, підвергнутій охолодженню на фоні введення ДГА- сульфата (група 2), також збільшується кількість преантральних і антральних фолликулів, кист в яєчниках не спостерігається. Це може свідчити про захисний вплив активованої БЖТ на регуляцію процесу дозрівання фолликулів. Відомо, що крыси, яким вводили екзогенний ДГА- сульфат, характеризуються значимим зниженням показників енергетичного обміну і активності БЖТ, що виражається в зменшенні експресії гена білка термогеніна (UCP1) і мітохондріального білка OXPHOS [3]. Крім того, у таких крыс було відзначено значиме зниження рівня циркулюючого адипонектину [6].

Механізм впливу БЖТ на ДГА- сульфат - індукційне кистоутворення в яєчниках, можливо, пов'язано з секрецією адипокинів (лептин, адипонектин) і інших системних регуляторів метаболізму, так як рівень адипонектину зменшується у жінок з СПКЯ [7]. Можливо, активація БЖТ шляхом тривалого холодного впливу призводить до підвищення рівня адипокинів, які опосередковано можуть впливати на секрецію гормонів репродукції і перешкодити розвитку кистозних змін в яєчниках.

**Висновки**

1. Гістологічний аналіз дозволяє зробити висновок про активацію БЖТ у крыс, підвергнених ПХВ (при +4°C впродовж 4 ч) протягом 25 днів.
2. Введення ДГА- сульфата 4-тижневим самкам крыс протягом 25 днів призводить до виникнення кист в яєчниках.
3. ПХВ на фоні введення ДГА- сульфата перешкоджає розвитку кистозних змін в яєчниках крыс.

**Перспективи подальших досліджень** заключаються в дослідженні низькотемпературного впливу на стан гормонального статусу крыс, викликаного експериментальним СПКЯ.

**Таблиця** – Кількість структурних елементів яєчників крыс різних груп (нормовані на 1 срез)

Група	Типи фолликулів					Жовте тіло	Кисти
	Примордіальний	Первинний	Преантральний+антральний	Зрілий	Атретический		
1	3,9±0,5	2,0±0,1	3,3±0,3	0,4±0,02	2,5±0,1	0,2±0,09	-
2	3,8±0,4	2,3±0,3	5,7±0,4*	0,1±0,01	2,2±0,3	0,2±0,1	-
3	4,2±0,6	2,5±0,2	4,1±0,2*	-	3,1±0,1*	0,1±0,08*	0,7±0,3*
5 (контроль)	3,8±0,4	1,9±0,3	3,2±0,4	0,2±0,04	2,1±0,2	0,2±0,02	-

**Примітка:** \* – різниця достовірна по відношенню до інтактного контролю, p<0,05.



## References

1. Hopchuk EN. Korrektsiya hiperandrohennykh narusheniy u zhenshchin s sindromom polikistoznykh yaichnikov. *Zdorove zhenshchiny: vseukr nauch-prakt zhurnal*. 2010; 8: 128–31. [Russian].
2. Patent 3527 Ukraine, МПК G09B 23/28(2006.01). Sposib modelyuvannya sindromu polikistoznykh yayechnikiv / IYu Kuzmina, OV Nikolayeva, MV Zhulikova. № u2017 0352711/04/17; opubl.07.08.2017. [Ukrainian].
3. Yuan X, Hu T, Zhao H, Huang Y, Ye R, Lin J, Zhang C, Zhang H, et al. Brown adipose tissue transplantation ameliorates polycystic ovary syndrome *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Mar 8; 113 (10): 2708-13. PMID: 26903641. PMCID: PMC4790997. DOI: 10.1073/pnas.1523236113.
4. Cameron IL, Smith RE. Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats. *J Cell Biol*. 1964 Oct; 23: 89-100. PMID: 14228521. PMCID: PMC2106505.
5. Cleary MP. The antiobesity effect of dehydroepiandrosterone in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991 Jan; 196 (1): 8-16. PMID: 1824576
6. Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jun 13; 6: CD001122. PMID: 22696324. DOI: 10.1002/14651858.CD001122.pub4.
7. Yildiz BO, Bozdogan G, Yapici Z, Esinler I, Yarali II. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Mum Reprod*. 2012 Oct; 27 (10): 3067-73. PMID: 22777527. DOI: 10.1093/humrep/des232.

УДК 616-001.18-092.9: 577.175.5

### ВПЛИВ ЗАГАЛЬНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЯЄЧНИКІВ ТА БУРОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Кузьміна І. Ю., Жулікова М. В., Божок Г. А.

**Резюме.** Для вивчення впливу загального охолодження на морфометричні показники яєчників і бурої жирової тканини (БЖТ), проведені дослідження на 40 білих самках щурів 4 тижневого віку лінії Vistar, масою 30-40г, які були розділені на 5 груп: 1-а - 8 щурів, які піддавалися постійному впливові холоду (ПВХ); 2-а - 8 щурів, яким на тлі ПВХ проводили введення дегідроепіандростендіола-сульфату (ДГА-сульфату), розчиненого в 0,2 мл очищеного і стерилізованого оливкового масла; 3-тя - 8 щурів, яким викликали експериментальний СПКЯ введенням тільки ДГА-сульфату, без ПВХ; 4-а група - 8 тварин, яким вводили тільки оливкове масло без ДГА-сульфату і ПВХ; 5-а - 8 щурів, яким нічого не вводили - інтактний контроль і не піддавали дії ПВХ. Встановлено, що введення ДГА-сульфату 4-тижневим самкам щурів протягом 25 діб призводить до виникнення кіст в яєчниках. Відбувається активація БЖТ у щурів, підданих ПВХ при +4 С на протязі 25 діб. ПВХ на тлі введення ДГА-сульфату перешкоджає розвитку кістозних змін у яєчниках у щурів.

**Ключові слова:** морфометрія, яєчники, бура жирова тканина, постійний холодний вплив.

UDC 616-001.18-092.9: 577.175.5

### Influence of General Cooling on Morphometric Indicators of Ovarians and Brown Fatty Tissue in Rats in Experiment

Kuzmina I. Yu., Zhulikova M. V., Bozhok G. A.

**Abstract.** To study the effect of total cooling on the morphometric parameters of the ovaries and brown fatty tissue (BFT), we carried out studies of 40 white 4-week-old female rats of the Vistar line, weighing 30-40, which were divided into 5 groups: 1st-8 rats, which were subjected to constant cold exposure (CCE); the 2nd – 8 rats who were injected with dehydroepiandrosterone-sulfate (DHA-sulfate) dissolved in 0.2 ml of purified and sterilized olive oil against the background of CCE; the 3rd – 8 rats, who were induced with experimental polycystic ovary syndrome (PCOS) by administration of only DHA-sulfate, without CCE; the 4th group – 8 animals, who received only olive oil without DHA-sulfate and CCE; and the 5th group comprised 8 rats, who did not receive anything: neither intact control nor CCE exposure.

The CCE was carried out by holding the animals for 4 hours in a chamber where the light regime and temperature of + 4 ° C. The remaining 20 h animals were in normal conditions of ambient temperature and light conditions. The rats were cooled daily for 25 days. At the 26th day, the animals were sacrificed; the ovaries and BFT were taken from the interscapular area. The organs were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours, after which it was transferred for 12 hours to a 25% sucrose solution on phosphate buffered saline (PBS). The organs in the mounting medium Tissue-Tek, were frozen and before the preparation of the cryostat sections were stored in nitrogen liquid. Histological examination was performed on BFT and ovaries of experimental animals.

For the preparation of cryostat sections, the organs were removed from the low-temperature storage and fabric sections were made with the thickness of 5  $\mu\text{m}$  on the cryovicrotome MEV (Germany). Sections were stained with hematoxylin and eosin according to the standard procedure. The number of adipocytes of BFT of different types was counted. The daily placement of rats in conditions of general cooling (4 h at + 4 ° C) led to a change in the cytomorphological characteristics of BFT. In group 1, there was a decrease in the number of type 1 and type 2 adipocytes in comparison with intact tissue. Visually, the tissue acquired a denser package and a pronounced brownish-brown color. Animals of the 2nd group, who underwent DHA- sulfate administration in conditions of general cooling, had sign characteristics of intact tissue: cells with large fat vacuoles were preserved. In this case, areas with tightly packed adipocytes with small fatty inclusions (A1) were alternated with zones represented by type 1 and type 2 adipocytes. Against the background of the introduction of DHA-sulfate without CCE (group 3), the main morphological features characteristic of groups 4 and 5 were preserved in BFT. Morphometric analysis allowed making a quantitative assessment of the changes in the cytomorphological profile of the BFT under the applied effects. A significant decrease in the number of A1 type cells in BFT animals with CCE (group 1) and A3 cells in BFT animals with CCE + DHA-sulfate (group 2) was found in comparison with the intact control. Changes occurred not only in the quantitative ratio of the types of adipocytes, but also in terms of area and diameter of lipid droplets.

Summarizing the results, it can be noted that under the influence of cold occur adaptive reactions in the BFT animals. These reactions are aimed at mobilizing lipid stocks to generate heat. It was found that the administration of DHA sulfate to 4-week-old female rats for 25 days leads to the development of cysts in the ovaries. Activation of BFT in rats subjected to CCE (at +4 C for 4 hours) was performed for 25 days. CCE on the background of the introduction of DHA-sulfate prevents the development of cystic changes in the ovaries of rats.

**Keywords:** morphometry, ovaries, brown fatty tissue, constant cold exposure.

Стаття надійшла 19.08.2017 р.

*Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*