

УДК 613.292:[547.918:593.96]:[591.465.31:599.323.4

*В.Г. Зенкина, В.С. Каредина, О.А. Солодкова,
Т.Н. Слуцкая, А.Л. Юферева*

МОРФОЛОГИЯ ЯИЧНИКОВ АНДРОГЕНИЗИРОВАННЫХ КРЫС НА ФОНЕ ПРИЕМА ЭКСТРАКТА ИЗ КУКУМАРИИ

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: яичник, эстральный цикл, андрогены, кукумария.

В повседневной работе врача-репродуктолога часто встречаются ситуации, когда изменения, характерные для старения репродуктивной системы, наблюдаются гораздо раньше, чем в среднем в популяции. К ним можно отнести хронический воспалительный процесс в малом тазу, различную эндокринологическую патологию, группу заболеваний, объединенных под общим названием «синдром поликистозных яичников», преждевременное истощение и резистентность гонад, при которых повышается интенсивность атрезии фолликулов разных стадий развития [1–4, 14, 15]. Применение различных химиотерапевтических препаратов для лечения вышеуказанных состояний не всегда оправданно. В настоящее время, с развитием натуротерапии, все большее значение приобретают препараты природного происхождения. Биологически активные вещества голотурий проявляют широкий спектр фармакологического действия [6, 7, 9, 11–13]. В связи с этим морфофункциональные изменения яичников при воздействии биологически активных веществ морских гидробионтов на фоне длительного гормонального расстройства представляют, по нашему мнению, значительный интерес.

Целью данной работы послужил анализ морфологии яичников андрогенизированных крыс при введении в рацион животных экстракта из кукумарии японской (ЭКЯ).

Эксперимент выполнялся на нелинейных белых крысах-самках, которых разделили на две группы:

- 1) крысы в возрасте 3,5 месяца, которым в неонатальном периоде проводили андрогенизацию путем подкожного введения 25 мкг тестостерона пропионата на 2-е сутки жизни (модель Э.М. Китаева [10]);
- 2) неонатально андрогенизированные самки, получавшие наряду с обычным кормом ЭКЯ в дозе 0,03 мл/кг с 1,5 до 3,5 месяца жизни.

Объект исследования — яичники 20 экспериментальных и 15 интактных (контроль) крыс, содержащихся в условиях одного вивария при обычном световом и температурном режимах. Кормление ЭКЯ осуществлялось в осенне-зимний период. На протяжении 2-го месяца эксперимента оценивали функциональное состояние яичников путем изучения эстрального цикла. В течение 20 дней подряд брали влагалищные мазки у крыс в опытной и контрольной группах с последующей окраской по Романовскому—

Гимза. В эксперименте использовали пищевую добавку ТИНРО-центра (г. Владивосток) «Тингол-2» — спиртовой ЭКЯ, содержащий тритерпеновые гликозиды не менее 550 мкг/см³.

Крыс забивали в утренние часы под легким эфирным наркозом методом декапитации (согласно правилам обращения с экспериментальными животными). Правый и левый яичники извлекали, фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 часов с последующим обезживанием в спиртах и заливкой в парафин. На санном микротоме получали серийные срезы толщиной 10 мкм. Для оценки количественных показателей брали каждый пятый срез. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили обзорное изучение структур органа. Подсчитывали среднее число примордиальных, растущих, преовуляторных и атретических фолликулов (в I–II стадии атрезии), желтых тел, общее число генеративных элементов, соотношение между числом растущих и атретических фолликулов, диаметр атретических фолликулов и желтых тел. Подсчет производили по всей поверхности среза. Примордиальные фолликулы учитывали в каждом 10-м срезе (и результат умножали на 10), растущие и атретические фолликулы — в каждом 5-м срезе (и результат умножали на 5). Зрелые фолликулы подсчитывали только в тех срезах, где они имели все структурные элементы, включая полноценную яйцеклетку с ядром и ядрышком. Желтые тела фиксировали в срединном срезе [5]. Морфометрию структурных элементов яичников осуществляли с помощью окуляр-микрометра (увеличение 15×20).

К моменту рождения в яичниках млекопитающих завершаются процессы формирования примордиальных фолликулов. На стадии диктиотены прекращается рост овоцита. В дальнейшем до момента полового созревания у животных в первичных фолликулах идет малый рост, который характеризуется накоплением питательных веществ и подготовкой первичных фолликулов к стадии большого роста. Именно в этот период возможно развитие гормонального дисбаланса в результате воздействия различных факторов, таких как тяжелые инфекции, интоксикации, гипоксия, гормональные препараты и т.д. [4, 8, 14, 15]. В соответствии с этим тестостерон, введенный крысам на 2-е сутки после рождения, вызывает, по нашим данным, достоверное уменьшение массы гонад и изменение их гистофизиологии на длительный период времени.

Обзорное изучение препаратов показало, что корковое вещество яичников редуцировалось (по сравнению с контролем). На серийных срезах общее число генеративных элементов было значительно снижено. При этом достоверно уменьшалось количество растущих и зрелых примордиальных фолликулов, а также желтых тел. Многие фолликулы уже на стадии примордиальных имели признаки атрезии. Их гибель начиналась с гибели яйцеклетки, ядро которой сморщивалось. Фолликулярные клетки сначала сохраняли целостность, затем исчезали. Чувствительными к действию препарата оказывались и растущие многослойные фолликулы



Рис. 1. Морфология яичников андрогенизированных животных.

а — растущие фолликулы с признаками деструкции у неонатально андрогенизированных животных; *б* — фолликулярная киста в яичнике андрогенизированного животного после введения в рацион ЭКЯ; *в* — киста желтого тела в яичнике андрогенизированного животного после введения в рацион ЭКЯ. Окр. гематоксилином и эозином, $\times 100$.

(рис. 1, а). Количество их достоверно снижалось по сравнению с контролем, причем основная масса находилась на стадии преантральных, количество же полостных форм составляло около 7%. На этом фоне во многих вторичных фолликулах отмечалась массовая гибель фолликулярного эпителия, утолщение блестящей оболочки, дезорганизация гранулезы и внутренней текальной оболочки. На препаратах, окрашенных метиленовым синим, определялись конденсация хроматина, выраженная фрагментация ядер фолликулоцитов. В цитоплазме клеток регистрировалось большое количество инвагинаций, а в некоторых участках формировались апоптотные тельца. Все эти процессы характеризуют разные стадии апоптоза в фолликулярном эпителии, которые хорошо контурировались на фоне дополнительной андрогенизации. Количество атретических фолликулов у неонатально андрогенизированных животных было достоверно выше, чем в контроле. Соотношение растущих и атретических фолликулов в данной группе животных составило 0,18 (в 2,5 раза меньше контрольных цифр). Зрелых, окончательно сформированных фолликулов в яичниках самок мы не обнаружили. На срединных срезах выявлены желтые тела (3–4 на один яичник), имевшие вид островков среди интерстициальной ткани. Данные структуры, по нашему мнению, не являются полноценными желтыми телами, а имитируют их, так как мы не нашли последовательных стадий развития желтых тел на препаратах, а также отсутствовали преовуляторные фолликулы, являющиеся их предшественниками. Таким образом, введение андрогенов крысам в раннем неонатальном периоде вызывало длительные нарушения роста и созревания фолликулов, отсутствие овуляции, а также гипертрофию стромы гонад с очагами лютеинизации.

Яичники андрогенизированных животных, получавшие ЭКЯ, характеризовались также достоверно меньшим числом примордиальных фолликулов. То же можно сказать и в отношении других структурных элементов гонад (табл.).

В этой группе животных недостоверно увеличилось количество растущих фолликулов, возрастало

в несколько раз число полостных и, следовательно, изменялось соотношение непустых и антральных фолликулов. Среди пузырчатых фолликулов встречались зрелые, но большинство из них имели признаки деструкции и лютеинизации. На препаратах были видны фолликулярные кисты (рис. 1, б).

У животных, получавших ЭКЯ, наблюдалось достоверное уменьшение количества атретических фолликулов, а соотношение растущих и атретических форм увеличивалось по сравнению с крысами, не получавшими пищевую добавку, до 0,35. На срединном срезе гонад контурировались мелкие желтые тела, появлялись кисты (рис. 1, в). Вероятно, мелкие желтые тела — это не что иное, как очаги гиперплазированной и лютеинизированной межтучной ткани (стромальный текоматоз), так как полноценных овуляторных фолликулов мы не наблюдали и желтые тела в стадии васкуляризации тоже отсутствовали. Размер кист колебался от 950 до 1200 мкм. Структура их была неоднородна, на одном из полюсов сохранялся островок лютеинизированной ткани. Общее число генеративных элементов составляло $1749,0 \pm 85,15$ (табл.).

У экспериментальных неонатально андрогенизированных животных, которым в рацион вводили ЭКЯ, наблюдались неоднозначные результаты. С одной стороны, мы добились увеличения количества растущих фолликулов, появления полостных форм, а также уменьшения числа атретических элементов. С другой стороны, на фоне этого кажущегося благополучия происходила чрезмерная стероидоподобная стимуляция гонад с образованием фолликулярных кист и кист желтых тел. Также мы наблюдали очаги гиперплазии межтучной ткани с появлением в ней групп гипертрофированных эпителиоидных клеток, формировавших участки текоматоза вне связи с фолликулами. Текоматозные очаги, в свою очередь, обладают высокой андрогенпродуцирующей активностью, что усугубляет дисбаланс стероидных гормонов в органе. По литературным данным, в патогенезе развития ретенционных кист яичников определенную роль играет воспалительный процесс и дисбаланс стероидных гормонов

Таблица

Количество генеративных элементов в яичниках андрогенизированных животных, $M \pm t$

Показатель	Экспериментальная группа	
	тестостерон	тестостерон+ЭКЯ
Примордиальные фолликулы	1080,0 $\pm$ 75,3	1110,0 $\pm$ 91,7
Растущие фолликулы	120,2 $\pm$ 11,1	160,3 $\pm$ 17,3
неполостные	112,1 $\pm$ 10,1	120,5 $\pm$ 12,8
полостные	8,1 $\pm$ 0,8	40,3 $\pm$ 4,1
Зрелые фолликулы	0	1,2 $\pm$ 0,1
Атретичные фолликулы	665,4 $\pm$ 25,7	475,6 $\pm$ 28,9
Растущие/атретичные фолликулы	0,18	0,34
Желтые тела	3,3 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,1
Общее количество генеративных элементов	1868,1 $\pm$ 71,7	1749,2 $\pm$ 85,2

[4, 8, 15]. Оофорит в данном случае практически невозможен. По данным А.С. Антонова и др., тритерпеновые гликозиды кукумарии обладают кортикостероидоподобным действием и оказывают противовоспалительный эффект [11–13]. Также имеются сведения о модифицирующем влиянии глюкокортикоидов на ароматазную активность фолликулярных клеток. Установлено как угнетающее действие, так и способность изменять ответ фолликулов на гонадотропный стимул [12]. За счет же каких механизмов биологически активные вещества морских гидробионтов усугубляют влияние андрогенов? Возможно, ЭКЯ усиливает действие текального организатора в клетках фолликулярного эпителия, что, в свою очередь, способствует гипертрофии соединительно-тканной оболочки фолликула. Андрогены теки фолликула в дополнение к внефолликулярному синтезу тестостерона из очагов текоматоза при повышенном уровне данных гормонов блокируют процесс ароматизации в клетках гранулезы. В дальнейшем относительно недостаточное количество эстрогенов по принципу обратной связи не вызывает овуляторного пика тропных гормонов, приводя к кистозной атрезии фолликула или лютеинизации. Также известно, что в тканях кукумарии имеются различные стероидные гормоны и гормоноподобные вещества, которые регулируют созревание и функцию половых желез, влияют на обмен веществ и активизируют деятельность ферментных систем [7, 11].

Таким образом, биологически активные вещества ЭКЯ обладают однонаправленным действием на структуры яичников, главным образом на атретичные фолликулы. Следовательно, ЭКЯ может быть использован в гинекологии в качестве биологически активной добавки в лечении заболеваний, сопровождающихся усиленной гибелью фолликулярного аппарата. Однако, учитывая возможность образования фолликулярных кист и кист желтого тела, необходимым условием применения данных пищевых добавок является определение исходного уровня стероидных гормонов.

Литература

1. Амтиславский С.Я., Ерошенко В.П. // Онтогенез. — 2000. — Т. 31, № 3. — С. 165–177.
2. Боровая Т.Г., Волкова О.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1995. — Т. 120, № 8. — С. 188–191.
3. Волкова О.В., Боровая Т.Г., Диденко Л.В. // Морфология. — 1999. — № 1. — С. 38–42.
4. Гилязутдинова З.Ш., Гилязутдинов И.А. // Вестник Рос. ассоциации акушеров-гинекологов. — 1999. — № 4. — С. 38–41.
5. Гольдберг Т.Д., Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Смирнова М.Е. // Бюл. эксперим. биологии и медицины — 1996. — Т. 122, № 11. — С. 571–573.
6. Ильичева Т.Н., Проняева Т.Р., Шульц Э.Э. и др. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2001. — № 2. — С. 53–56.
7. Исай С.В., Ключникова Н.Ф., Ключников М.Т. // Биологические аспекты животноводства Дальнего Востока : сб. научных трудов Дальневосточного научно-исследовательского ин-та сельского хозяйства. — Хабаровск, 1999. — С. 49–54.
8. Литвинова Л.Б. // Физиол. журн. (Украина). — 2001. — Т. 47, № 2. — С. 93–99.
9. Масленникова В.Н., Куликова С.Е. // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины : тезисы докладов IV Тихоокеанской научно-практической конф. — Владивосток, 2003. — С. 8–9.
10. Никитин А.И., Кутаев Э.М. // Арх. анатомии, гистол. и эмбриол. — 1987. — Т. 93, № 7. — С. 69–78.
11. Antonov A.S., Kalinovsky A.I., Stonik V.A. // Tetrahedron Lett. — 1998. — Vol. 39. — P. 3807–3808.
12. Avilov S.A., Drozdova O.V., Kalinin V.I. et al. // Can. J. Chem. — 1998. — Vol. 76. — P. 137–141.
13. Avilov S.A., Kalinovskiy A.I., Stonik V.A. et al. // J. Nat. Prod. (Lloydia). — 1997. — Vol. 60. — P. 808–810.
14. Buckov A.G., Hafne A.L., C. Yding Andersen, Tverdal A. // Reprod. Pomest. Anim. — 2000. — Vol.35, No. 1. — P. 7.
15. Pinila L., Gonzalez L.C., Gaytan F. et al. // Reproduction. — 2001. — Vol. 121, No. 6. — P. 915–924.

Поступила в редакцию 17.09.2007.

OVARY MORPHOLOGY IN ANDROGENIZED RATS WHEN TAKING CUCUMARIA-CONTAINING EXTRACT
V.G. Zenkina, V.S. Karedina, O.A. Solodkova, T.N. Slutskaya, A.L. Yufereva

Vladivostok State Medical University

Summary — The authors carried out experiments on rats and studied features of ovary morphology during long-term hormonal background disorders and under the action of biologically active substances of Cucumaria japonica. Introduction of androgens in rat's early neonatal period caused long-term estrous cycle disorders and resulted in worsening processes of follicle growth and maturation, mass atresia of follicles, as well as anovulation and stromal hypertrophy of gonads with luteinization foci. Intake of Cucumaria japonica-containing extract did not have an effect on structural and functional changes in organs: the number of cavity follicles increased very slightly, the number of atretic follicles somewhat decreased, but there were follicular and corpus luteum cysts.

Pacific Medical Journal, 2007, No. 4, p. 70–72.