

DOI: 10.26693/jmbs03.03.025

УДК 616-001.18-092.9: 577.175.5

Кузьмина И. Ю., Жуликова М. В.

СОСТОЯНИЕ ЭНДОМЕТРИЯ И ЯИЧНИКОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ НА ФОНЕ ПОСТОЯННЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

irina.u.kuzmina@gmail.com

Исследованы морфометрические показатели эндометрия и яичников крыс на фоне постоянных холодových воздействий при экспериментальном моделировании синдрома поликистозных яичников путем введения дегидроэпиандростерона.

Постоянное холодovое воздействие осуществляли путем ежедневного выдерживания животных в течение 4 часов в камере, в которой поддерживались световой режим и температура +4° С. Введение дегидроэпиандростерона молодым крысам в течение 25 суток приводят к возникновению в яичниках и матке характерных для синдрома поликистозных яичников признаков: утолщению слоя текальных клеток, уменьшению количества желтых тел, возникновению кист, утолщению стенки матки и гиперплазии эндометрия.

Стимуляция адаптивных физиологических реакций на фоне постоянных холодových воздействий блокирует развитие признаков синдрома поликистозных яичников у крыс.

Ключевые слова: морфометрические характеристики, эндометрий крыс, синдром поликистозных яичников, холодovое 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», № государственной регистрации 0115U000991.

Введение. Синдром поликистозных яичников (СПЯ) – полиморфное заболевание с чрезвычайно вариабельной клинической картиной, которое характеризуется нарушением репродуктивной и менструальной функции, а также обусловлен целым рядом факторов, главными из которых являются повышенная продукция андрогенов, гиперинсули-

немическая инсулинорезистентность (ИР), хроническая ановуляция и нарушение регуляции гормонов репродукции [1, 2].

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 [3]. Помимо этого, ИР и нарушение регуляции гормонов репродукции связаны с процессами, происходящими в жировой ткани [4].

При исследовании патогенеза развития СПЯ была установлена прямая связь данного заболевания с уровнем адипонектина, лептина и резистина в организме, которые принимают активное участие в энергетическом обмене яичниковой ткани [5, 6]. Известно, что уровень адипонектина повышается в условиях продолжительных холодových воздействий или акклиматизации [7, 8].

Целью исследования явилось изучение морфометрических показателей эндометрия и яичников крыс при постоянных холодových воздействиях (ПХВ) на фоне экспериментального моделирования СПЯ, путем введения дегидроэпиандростерона (ДГЭА)

Объект и методы исследования. Исследования проведены на самках крыс Вистар (n=32) 27-дневного возраста, массой 30-40 г.

Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Пятым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013).

Поликистозный процесс в яичниках моделировали путем ежедневного (в течение 25 суток) подкожного введения ДГЭА («Sigma», США),

растворенного в 0,2 мл очищенного и стерилизованного оливкового масла. Доза ДГЭА составляла 60 мг/кг массы.

ПХВ осуществляли путем ежедневного выдерживания животных в течение 4 часов в камере, в которой поддерживались световой режим и температура +4°C. Оставшиеся 20 ч животные находились в обычных условиях содержания.

Животные были разделены на 4 группы: 1 группа – животные, которые подвергались ПХВ (n=8); 2 группа – животные, которым на фоне ПХВ проводили введение ДГЭА (n=8); 3 группа – животные, которым вызывали экспериментальный СПКЯ введением ДГЭА (n=8); 4 группа – интактный контроль (n=8).

На 26 сутки животных выводили их эксперимента, забирали матку и яичники. Органы взвешивали, после чего фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФА, «Sigma») в течение 4 ч, после чего переносили на 12 часов в 25% раствор сахарозы на фосфатно-солевом буфере. Замораживали органы в монтирующей среде Tissue-Tek («Sakura», Япония) и до приготовления криостатных срезов хранили в жидком азоте.

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.

Морфометрический анализ яичников включал подсчет количества кист, желтых тел и измерение слоя текальных клеток третичных фолликулов. Подсчеты производили на 15 срезах ткани яичников, полученных от каждого из экспериментальных животных. Морфометрический анализ ткани матки включал измерение высоты эпителия, количество желез на единицу площади, толщину стенки. Данные массы яичников и матки представлены в процентах от массы тела.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Excel» и «Stactica 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.

На рисунке 1 представлены данные относительно массы яичников и матки экспериментальных животных четырех групп. Заметно, что ни ПХВ, ни введение ДГЭА не влияло на среднюю относительную массу яичников, тогда как показатели массы матки различались между группами. Относительная масса матки значительно увеличивалась в группах с введением ДГЭА (группы 2 и 3) по сравнению с интактным контролем.

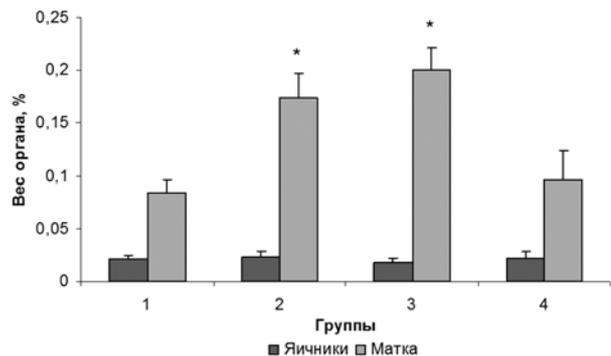


Рис. 1. Относительная масса яичников и матки крыс разных экспериментальных групп

Примечание: * – показатель значительно отличается по сравнению с интактным контролем, $P < 0,05$.

Такую же тенденцию к увеличению массы матки у крыс с экспериментальной моделью СПКЯ наблюдали Zhang Y. и соавт [9].

Известно, что одним из характерных признаков СПКЯ является гиперплазия текальных клеток яичников [4, 10, 11].

При измерении толщины слоя текальных клеток в яичниках крыс (рис. 2) было установлено, что данный показатель имеет тенденцию к возрастанию в группах с ПХВ (группы 1 и 2) и значительно увеличивается в 3-й группе (введение ДГЭА) по

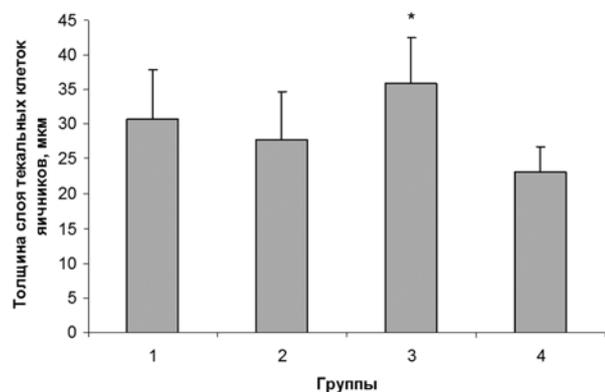


Рис. 2. Толщина слоя текальных клеток яичников разных экспериментальных групп

Примечание: * – показатель значительно отличается по сравнению с интактным контролем, $P < 0,05$.

сравнению с интактным контролем. Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что экзогенное введение андрогенов в организм экспериментальных животных приводит к гиперплазии текальных клеток как характерного признака СПКЯ. Однако интересен факт некоторого расширения слоя текальных клеток в 1-й группе (без введения ДГЭА, но с ПХВ). Полученные нами данные позволяют предположить, что в условиях холодового стресса происходит активация секреции андрогенов надпочечниками, что приводит к незначительной гиперплазии текальных клеток яичников.

Известно, что дисфункция яичников при СПКЯ характеризуется уменьшением количества зрелых фолликулов и, соответственно, желтых тел. В наших экспериментах установлено, что количество желтых тел в группе с моделью СПКЯ было достоверно меньше, чем в контроле ($0,1 \pm 0,05$ в группе 3 против $0,2 \pm 0,01$ в контроле, $p < 0,05$). Кроме того, это была единственная группа животных, в яичниках которых наблюдалось формирование кист. Несмотря на то, что в группах с ПХВ (группы 1 и 2) была тенденция к увеличению толщины слоя текальных клеток, нами не было обнаружено в яичниках кист, и количество желтых тел не отличалось от интактного контроля.

Эндометрий представляет собой слизистую оболочку, выстилающую полость матки, который реагирует на циклические изменения эстрогенов и прогестерона в менструальном цикле яичников. Фолликулярная (пролиферативная) фаза эндометрия связана с ростом фолликула в яичнике и повышенной секрецией эстрогенов. При СПКЯ в отсутствии овуляции и регуляции посредством прогестерона, секретиремого желтым телом, эндометрий постоянно подвергается митогенному воздействию эстрогенов, что приводит к его разрастанию. В предыдущих работах установлено увеличение толщины эндометрия у женщин с СПКЯ, или в экспериментальных моделях СПКЯ у крыс [9, 12, 13].

Микроскопическое исследование ткани матки в группе крыс с моделью СПКЯ (группа 3) показало увеличение высоты эпителия эндометрия, количества желез и утолщение стенки матки (табл.). В

Таблица – Морфометрические показатели эндометрия, количества желез и утолщения стенки матки в исследуемых группах

Группы	Высота эпителиальной клетки, мм	Толщина стенки матки, мм	Люмены желез, число / поле
1	$5,6 \pm 0,2$	$496,2 \pm 39,4$	$5,4 \pm 1,4$
2	$5,8 \pm 0,3$	$481,8 \pm 36,3$	$5,3 \pm 0,9$
3	$6,1 \pm 0,4$	$675,4 \pm 40,6^*$	$27,8 \pm 5,9^*$
4	$5,7 \pm 0,1$	$498,7 \pm 23,5$	$5,0 \pm 1,3$

группе с моделированием СПКЯ на фоне ПХВ, как и в группе с ПХВ данные показатели были на уровне интактного контроля. Визуально, гистологическая картина в группах крыс с СПКЯ отличалась от других групп (рис. 3) и характеризовалась увеличением количества желез и расширением их просветов.

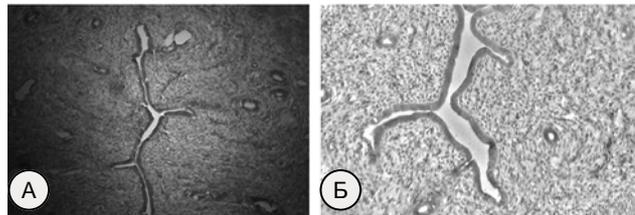


Рис. 3. Гистологические образцы матки крыс группы с введением ДГЭА (А) и группы с введением ДГЭА на фоне ПХВ (Б). Ув. $\times 20$

Выводы. Введение ДГЭА молодым крысам в течение 25 суток приводят к возникновению в яичниках и матке характерных для СПКЯ признаков: утолщению слоя текальных клеток, уменьшению количества желтых тел, возникновению кист, утолщению стенки матки и гиперплазии эндометрия. Стимуляция адаптивных физиологических реакций на фоне длительных холодовых воздействий блокирует развитие признаков СПКЯ у крыс при введении ДГЭА.

Перспективы дальнейших исследований заключаются в исследовании влияния длительных холодовых воздействий на бурую жировую ткань мишей в эксперименте.

References

1. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol Hum Reprod.* 2013 Dec; 19 (12): 828-37. PMID: 24026057. PMCID: PMC3843026. DOI: 10.1093/molehr/gat065
2. Silfen ME, Denburg MR, Manibo AM, Lobo RA, Jaffe R, Ferin M, Levine LS, Oberfield SE. Early endocrine, metabolic, and sonographic characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS): comparison between nonobese and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Oct; 88 (10): 4682-8. PMID: 14557441. DOI: 10.1210/jc.2003-030617
3. Groth SW. Adiponectin and polycystic ovary syndrome. *Biol Res Nurs.* 2010 Jul; 12 (1): 62-72. PMID: 20498127. PMCID: PMC3646519. DOI: 10.1177/1099800410371824

4. 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
5. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016 Apr 1; 26 (1): 25-42. PMID: 26910750. DOI: 10.1515/hmbci-2015-0073
6. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Nov; 1212: E1-E19. PMID: 21276002. PMCID: PMC3075414. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x
7. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, Hansen J, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*. 2013 Aug; 123(8): 3395-403. PMID: 23867626. PMCID: PMC3726172. DOI: 10.1172/JCI68993
8. Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Vucetic M, Markelic M, Velickovic K, Golic I, Korac B. Endocrine and metabolic signaling in retroperitoneal white adipose tissue remodeling during cold acclimation. *J Obes*. 2013; 2013: 937572. PMID: 23710349. PMCID: PMC3655592. DOI: 10.1155/2013/937572
9. Zhang Y, Hu M, Meng F, Sun X, Xu H, Zhang J, Cui P, Morina N, Li X, et al. Metformin Ameliorates Uterine Defects in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *EBioMedicine*. 2017 Apr; 18:157-70. PMID: 28336389. PMCID: PMC5405166. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.03.023
10. Will MA, Palaniappan M, Peegel H, Kayampilly P, Menon KM. Metformin: direct inhibition of rat ovarian theca-interstitial cell proliferation. *Fertil Steril*. 2012 Jul; 98 (1): 207-14. PMID: 22608319. PMCID: PMC3389190. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.010
11. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev*. 2016 Oct; 37 (5): 467-520. PMID: 27459230. PMCID: PMC5045492. DOI: 10.1210/er.2015-1104
12. Shah B, Parnell L, Milla S, Kessler M, David R. Endometrial thickness, uterine, and ovarian ultrasonographic features in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2010 Jun; 23 (3): 146-52. PMID: 19733099. DOI: 10.1016/j.jpog.2009.07.002
13. Mirabolghasemi G, Kamyab Z. Changes of The Uterine Tissue in Rats with Polycystic Ovary Syndrome Induced by Estradiol Valerate. *Int J Fertil Steril*. 2017 Apr-Jun; 11 (1): 47-55. PMID: 28367305. PMCID: PMC5215711

УДК 616-001.18-092.9: 577.175.5

**СТАН ЕНДОМЕТРІЯ І ЯЄЧНИКІВ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ
МОДЕЛЮВАННІ СИНДРОМУ ПОЛІКІСТОЗНИХ ЯЄЧНИКІВ НА ТЛІ
ПОСТІЙНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ**

Кузьміна І. Ю., Жулікова М. В.

Резюме. Досліджено морфометричні показники ендометрія і яєчників щурів на тлі постійних холодових впливів при експериментальному моделюванні синдрому полікістозних яєчників шляхом введення дегідроепіандростерона.

Постійних холодовий вплив здійснювали шляхом щоденного витримування тварин протягом 4 годин на камері, в якій підтримувалися світловий режим і температура + 4° С. Введення дегідроепіандростерона молодим щурам протягом 25 діб призводять до виникнення в яєчниках і матці характерних для синдрому полікістозних яєчників ознак: потовщення шару текальних клітин, зменшення кількості жовтих тіл, виникнення кіст, потовщення стінки матки і гіперплазії ендометрія.

Стимуляція адаптивних фізіологічних реакцій на тлі постійних холодових впливів блокує розвиток ознак синдрому полікістозних яєчників у щурів.

Ключові слова: морфометричні характеристики, ендометрій щурів, синдром полікістозних яєчників, холодовий вплив.

UDC 616-001.18-092.9: 577.175.5

**The Condition of the Rats' Endometrium and Ovaries during
Experimental Modeling of the Polycystic Ovary Syndrome in Terms
of Constant Cold Exposure**

Kuzmina I. Yu., Zhulikova M. V.

Abstract. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is characterized by a violation of reproductive and menstrual function and is due to a number of factors. The main factors are: increased production of androgens, insulin resistance and disruption of the regulation of reproduction hormones.

The purpose of this work was to study the morphometric parameters of the endometrium and ovary of rats in terms of constant cold exposure (CCE) and experimental PCOS modeling by introducing dehydroepiandrosterone (DHEA).

Material and methods. Studies were performed on female Wistar rats (n = 32) of 27-day-old age, weighing 30–40 g.

The polycystic process in the ovaries was modeled by daily (for 25 days) subcutaneous administration of DHEA ("Sigma", USA) dissolved in 0.2 ml of purified and sterilized olive oil. The dose of DHEA was 60 mg / kg of body weight. CCE was carried out by daily keeping the animals for 4 hours in a chamber where the light regime and the temperature of + 4° C were maintained. The remaining 20 h animals were in normal conditions of detention.

Animals were divided into 4 groups: the 1st group – animals that were exposed to CCE (n = 8); the 2nd group – animals were treated with DHEA (n = 8) with CCE; the 3rd group 3 – animals who were challenged with experimental PCOS by the administration of DHEA (n = 8); the 4th group – intact control (n = 8). On the 26th day the animals were sacrificed, the uterus and ovaries were taken. The organs were weighed and then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, "Sigma") for 4 hours, after that they were transferred for 12 hours to a 25% sucrose solution on phosphate buffered saline.

Results and discussion. Results indicate that the exogenous introduction of androgens into the body of experimental animals leads to hyperplasia of the thecal cells as a characteristic feature of PCOS.

The obtained data suggest that in terms of cold exposure, the secretion of endogenous androgens by the adrenals is activated, which leads to a slight hyperplasia of the thecal ovarian tissue cells.

Endometrium is a mucous membrane lining the uterine cavity, which reacts to cyclic changes in estrogen and progesterone in the menstrual cycle of the ovaries. The follicular (proliferative) phase of the endometrium is associated with the growth of the follicle in the ovary and the increased secretion of estrogens. In PCOS, in the absence of ovulation and regulation through progesterone secreted by the yellow body, the endometrium is constantly exposed to the mitogenic effects of estrogens, which leads to its proliferation.

Microscopic examination of uterine tissue in a group of rats with a PCOS model (Group 3) showed an increase in the height of the endometrial epithelium, the number of glands and the thickening of the uterine wall. In the group with PCOS simulation in terms of CCE, as in the group with CCE, these indicators were at the level of intact control. Visually, the histological pattern in the groups of rats with PCOS differed from the other groups and was characterized by an increase in the number of glands and with expansion of their lumens.

Conclusions. The introduction of DHEA to young rats during 25 days leads to the appearance of PCOS characteristics symptoms in the ovaries and uterus: thickening of the cells layer, decrease in the number of yellow bodies, the appearance of cysts, thickening of the uterine wall and endometrial hyperplasia. Stimulation of adaptive physiological reactions in terms of prolonged cold effects blocks the development of PCOS signs in rats with the administration of DHEA.

Keywords: morphometric characteristics, rat endometrium, polycystic ovary syndrome, cold exposure.

Стаття надійшла 26.02.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування