

Нейроендокринні механізми розвитку ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження у щурів

Ановуляторний синдром у половозрелых самок крыс вызывали с помощью подкожной имплантации силикатиковых капсул с тестостероном. Гиперандрогенемия привела к интенсификации метаболической ароматизации тестостерона в гипоталамусе, снижению чувствительности гипофиза к лютеинизирующего-рилизинг гормона, повышению уровня циркулирующего лютеинизирующего гормона в крови, а также к нарушению эстральных циклов и появлению комплекса морфологических изменений в яичниках, что свидетельствует о нарушении нейроендокринной регуляции овуляции.

Вступ

Частота ендокринної неплідності, спричиненої надміром андрогенів в організмі, становить 30—40 % випадків жіночої неплідності [3]. Гіперандрогенія є наслідком підвищеної продукції андрогенів корою надниркових залоз (адреногенітальний синдром) або яєчниками (синдром склерокістозних яєчників). Зміни гормонального балансу, що виникають за цих патологічних станів, характеризуються порушенням взаємовідносин у системі гіпоталамус — гіпофіз — яєчники [8, 11].

Для моделювання в експерименті ановуляторного синдрому (АС) з метою вивчення його патогенезу застосовують різні підходи: неонатальну андрогенізацію [4, 7], деаферентацію медіобазального гіпоталамусу [5, 13], трансплантацію яєчників у середовище зі зниженою температурою [2] тощо. Однак усі зазначені експериментальні підходи не можуть правити за модель АС гіперандрогенного походження, оскільки гормональні та морфологічні зміни, які виникають внаслідок неонатальної андрогенізації, не адекватні таким у хворих на синдром склерокістозних яєчників [12], а при інших методичних підходах ановуляція не є результатом гіперандрогенізації.

У дослідженні Loke із співавт. [16], де гіперандрогенного стану у щурів досягали за допомогою імплантації капсул з тестостероном (Т), показано, що тривале діяння андрогенів може спричинити ослаблення або повну блокаду преовуляторного підйому секреції лютеїнізуючого гормону (ЛГ). Цей висновок зроблено на підставі вивчення рівня ЛГ у крові після введення андрогенізованим самкам естрадіолу. Однак такий підхід не дає змоги виявити, на якому саме рівні — гіпоталамічному чи гіпофізарному — має місце ушкодження регуляції секреції гонадотропних гормонів. Тому метою нашої роботи було вивчення нейроендокринної ланки патогенезу ановуляторної неплідності гіперандрогенного походження на новій адекватній моделі цього захворювання.

Методика

Для моделювання ановуляторного синдрому гіперандрогенного генезу було застосовано капсули, виготовлені із силастикової трубки із зовнішнім діаметром 3,18 мм і внутрішнім 1,57 мм, завдовжки 5 мм, заповнені кристалічним Т (Koch-Light Labs, Англія) у кількості 5 мг та заклеєні силіконовим клеєм. Перед імплантацією капсули проінкубували у фізіологічному розчині, забуференому 0,15 моль/л фосфатним буфером (рН 7,2) протягом 48 год при 37 °С. Капсули імплантували під шкіру задньої поверхні шиї самок щурів на стадії метаеструсу. З наступної доби після імплантації розпочинали мікроскопічне дослідження вагінальних мазків. Через 10 діб після підсадки капсул частину тварин декапітували, провадили аналіз матки й яєчників, після чого останні фіксували в рідині Буена для наступного гістологічного дослідження. На холоді видаляли гіпоталамуси для вивчення метаболізму Т. У плазмі крові визначали концентрацію Т і біологічно активного ЛГ.

В іншій частині тварин вивчали реакцію гіпофіза на введення ЛГ-рілізінг-гормону (ЛГ-РГ). Для цього самкам щурів під ефірним наркозом вводили у зовнішню яремну вену силастиковий катетер [14]. Через 1 доб після операції провадили фоновий забір крові, потім вводили ЛГ-РГ фірми «Serba», (ФРН) у дозі 25 нг в об'ємі 250 мкл фізіологічного розчину і повторно забирали кров через 10, 20 і 30 хв після ін'єкції ЛГ-РГ. В одержаній плазмі крові визначали вміст ЛГ.

Концентрацію Т у плазмі крові визначали радіоімунологічним методом за допомогою наборів «Стерон-Т-³Н» (ІБОХ АН Беларусі), вміст біологічно активного ЛГ — за методом van Damme із спіавт. [10] у модифікації Baraghini із спіавт. [6] на суспензії інтерстиціальних клітин сім'яників мишей із застосуванням стандарту ЛГ людини фірми «Sigma» (США), каліброваного за І Міжнародним стандартним препаратом 68/40.

Метаболічні перетворення Т у гіпоталамусі вивчали за допомогою інкубації надосадового шару після центрифугування при 1000 x g 10 %-го гомогенату тканини гіпоталамуса з [1, 2, 6, 7—³Н] фірми «Amersham» (Англія) в присутності НАД · Н фірми «Reanal» (Угорщина) і наступного видалення утворених метаболітів двомірною хроматографією у тонкому шарі силікагелю [17]. Після радіометрії плям, що відповідали естрадіолу, 5α-дигідротестостерону (ДГТ) та 5α-андростан-3α, 17β-діолу (3α-діол), підраховували активність ферментів метаболізму Т. Активність ароматази виражали в пмоль утвореного протягом 1 год естрадіолу, 5α-редуктази — як суму утворених ДГТ і 3α-діолу. Вміст білка в інкубатах визначали за методом Лоурі. Статистичну обробку результатів проведено із застосуванням критерію t Стюдента.

Результати та їх обговорення

За перші доби після імплантації капсул із Т у всіх дослідних тварин порушувались естральні цикли: у 20 % самок спостерігалися нерегулярні цикли із тривалішою фазою дієструсу, 40 % тварин лишалися на стадії персистентного дієструсу, а у 40 % розвивався персистентний еструс. Аналіз маси яєчників і матки (після видалення рідини) показав, що у самок з АС маса цих органів знижувалась у 1,5 та 2,1 рази відповідно порівняно з інтактними тваринами, які перебували на стадії дієструсу (табл. 1). Гістологічні дослідження підтвердили ановуляторний стан. При АС свіжі жовті тіла були відсутні. Зберігалися лише інволюючі та старі жовті тіла попе-

Таблиця 1. Вміст біоактивного лютеїнізуючого гормону в плазмі крові та маса матки й яєчників у самок щурів з ановуляторним синдромом гіперандрогенного генезу ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Концентрація МО, теїнізуючого гормону, МОд/л	Відносна маса, мг/100 г	
		яєчників	матки
Інтактні тварини (контроль)	$3,72 \pm 0,21$	$37,6 \pm 2,0$	$273,5 \pm 31,9$
Тварини з модельованим ановуляторним синдромом	$4,93 \pm 0,50$ $P = 0,05$	$24,3 \pm 3,5$ $P < 0,01$	$126,7 \pm 4,8$ $P < 0,001$

редніх генерацій. Крім того, в яєчниках андрогенізованих тварин частіше, ніж у контрольних, спостерігалось значне потоншення фолікулярного епітелію, при цьому зберігалися 1—2 шари клітин у вторинних і третинних фолікулах, а клітини внутрішньої оболонки були гіпертрофовані. Після імплантації капсул з андрогеном концентрація Т у плазмі крові дослідних тварин підвищувалася до $14,17 \text{ нмоль/л} \pm 1,12 \text{ нмоль/л}$ проти $1,51 \text{ нмоль/л} \pm 0,23 \text{ нмоль/л}$ у інтактних самок ($P < 0,001$).

На фоні значного підвищення вмісту Т у плазмі крові, що був зумовлений надходженням андрогену з імплантатом, рівень біологічно активного ЛГ достовірно збільшувався.

Провідним патогенетичним фактором розвитку ановуляції у дослідних самок є, очевидно, гальмування циркулюючими андрогенами реактивності гіпоталамо-гіпофізарного комплексу до позитивного діяння естрогенів яєчників і, як наслідок цього, пригнічення преовуляторного викиду ЛГ. Останнє припущення узгоджується з даними досліджень Loke із співавт. [16]. В основі такого пригнічення, ймовірно, знаходяться встановлені нами зміни функціонального метаболізму Т у гіпоталамусі та чутливості гіпофіза до ЛГ-РГ.

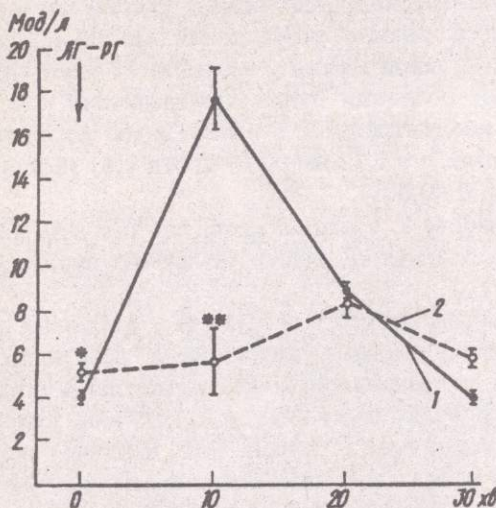
Активність ферментів ароматазного комплексу в гіпоталамусі самок з АС підвищувалася на 39 % (табл. 2). Процеси 5α -відновлення Т дещо активізувались, але це підвищення не досягало рівня вірогідності.

Таблиця 2. Активність ферментів метаболізму тестостерону в гіпоталамусі самок щурів з ановуляторним синдромом ($M \pm m$), $n=6$

Група тварин	Ароматаза, пмоль ест- радіолу/год т білка	5α -Редуктаза, нмоль (ДГТ + 3 α -діол)/год т білка
Інтактні тварини (контроль)	$12,31 \pm 0,63$	$0,86 \pm 0,16$
Тварини з модельованим ановуляторним синдромом	$17,16 \pm 1,87^*$	$1,36 \pm 0,21^*$

Зважаючи на максимальну зміну концентрації ЛГ у плазмі крові після внутрішньовенного введення синтетичного ЛГ-РГ, чутливість гонадотропоцитів до гонадоліберину при АС у 4 рази нижча, ніж у контрольних самок на стадії дієструсу (див. рисунок). Приріст ЛГ у відповідь на введення ЛГ-РГ у інтактних самок становив $13,43 \text{ МОд/л} \pm 1,28 \text{ МОд/л}$ у андрогенізованих тварин значення цього показника було $3,40 \text{ МОд/л} \pm 0,42 \text{ МОд/л}$ ($P < 0,001$). Крім того, пік реакції гіпофіза на введення ЛГ-РГ при АС дещо відстрочений у часі порівняно з інтактними тваринами. Мабуть, це є наслідком прямого пригнічувального впливу надлишку Т на гіпофізарні гонадотропоцити. Зокрема, Labrie із співавт. [15] було показано, що попередня інкубація первинної культури клітин аденогіпофіза з андрогенами гальмує підйом секреції ЛГ-РГ, викликаний введенням його у середовище.

Інтенсифікацію локального утворення естрадіолу в гіпоталамусі самок з АС можна пояснити субстратною індукцією активності ферменту з боку Т, концентрація якого в плазмі крові підвищена. Такий феномен продемонстровано для ароматазної активності в гіпоталамусі статевозрілих самців щурів [18] і морських свинок [19]. Цілком вірогідно, що подібна залежність активності ферментів ароматазного комплексу від андрогенної насиченості організму, опосередкована рецепторами андрогенів, справедлива і для самок. У свою чергу, посилення локального утворення естрогенних метаболітів Т у гіпоталамусі має позначитися на регуляції секреції гона-



Реакція гіпофіза на введення лютеїнізуючого-рілізінг гормону самкам з ановуляторним синдромом гіперандрогенного генезу: 1 — контроль, 2 — ановуляторний синдром; * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

дотропних гормонів гіпофіза. Відомо, що регуляція базальної секреції гонадотропінів здійснюється в результаті негативного діяння статевих гормонів у системі зворотного зв'язку, тоді як циклічна секреція гонадотропінів запущається позитивною дією естрогенів, що секретуються фолікулами у фазі їх швидкого росту перед овуляцією [1].

Можна припустити, що концентрація естрадіолу в гіпоталамусі самок із АС вища, ніж у інтактних тварин. Постійно високий рівень естрогенів у гіпоталамусі, ймовірно, призводить до стимуляції секреції ЛГ гіпофізом і підвищення його вмісту в плазмі крові, недостатньої, однак, для настання овуляції.

Таким чином, гіперандрогенія у статевозрілих самок щурів спричинює ановуляторний стан внаслідок порушення функціонування основних регуляторних механізмів, що забезпечують овуляцію, на гіпоталамічному та гіпофізарному рівнях.

Висновки

1. Розроблено експериментальну модель ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження за допомогою імплантації щурам силастикових капсул, що містять тестостерон.

2. Інтенсифікація метаболічної ароматизації тестостерону в гіпоталамусі, зниження чутливості гіпофіза до релізінг-лютеїнізуючого гормону, підвищення рівня циркулюючого біоактивного лютеїнізуючого гормону, порушення естральних циклів разом з комплексом морфологічних змін у яєчниках андрогенізованих самок щурів свідчать про порушення нейроендокринної регуляції процесів, що забезпечують овуляцію, за умов підвищеного вмісту андрогенів в організмі.

A.G.Reznikov, P.V.Sinitsyn, L.V.Tarasenko, L.I.Polyakova

NEUROENDOCRINE MECHANISMS OF DEVELOPMENT OF HYPERANDROGENIC ANOVULATORY SYNDROME IN RATS

The anovulatory syndrome in adult female rats occurred after subcutaneous implantation of silastic capsules with testosterone. Acceleration of testosterone conversion into estradiol in the hypothalamus, suppression of pituitary LH responsiveness to LHRH, increase of blood plasma bioactive LH, estrous cycle disorders as well as morphological changes in ovaries demonstrate the alterations in neuroendocrine control of ovulation.

V.P.Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабичев В.Н. Нейрогормональная регуляция овариального цикла. — М.: Медицина. — 1984. — 240 с.
2. Вундер П.А., Сметанина М.Д. О механизме возникновения эструса у крыс после трансплантации яичников в среду с пониженной температурой // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1983. — 95, № 3. — С. 103—105.
3. Гинекологическая эндокринология / Под ред. К.Н.Жмакина. — М.: Медицина. — 1980. — 607 с.
4. Резников А.Г., Носенко Н.Д., Демченко В.Н., Шевчук О.П. Особенности гипоталамо-гипофизарной регуляции, морфологического и функционального состояния репродуктивных органов у неонатально андрогенизированных самок крыс в зависимости от времени воздействия тестостерона // Пробл. эндокринологии. — 1976. — № 5. — С. 71—77.
5. Савченко О.Н., Пропи М.В., Данилова О.А. и др. Гипоталамо-гипофизарно-овариальная система у крыс после деафферентации медиобазального гипоталамуса // Физиол. журн. СССР. — 1982. — № 9. — С. 1189—1195.
6. Baraghini C.F., Celani M.F., Zaidi A.A. et al. Problems associated with the in vitro bioassay of serum luteinizing hormone (LH) on mouse Leydig cell preparations: methodological aspects // J.Endocrinol. Invest. — 1984. — 7, Suppl. 3. — P. 23—31.
7. Barraclough C.A. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate // Endocrinology. — 1961. — 68. — P. 62—67.
8. Berga S.L., Guzick D.S., Winters S.J. Increased luteinizing hormone and α -subunit secretion in women with hyperandrogenic anovulation // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1993. — 77. — P. 895—902.
9. Connolly P.B., Roselli C.E., Resko J.A. Aromatase activity in adult guinea pig brain is androgen dependent // Biol. Reprod. — 1990. — 43. — P. 698—703.
10. Danne M.V.van, Robertson D.M., Diczfalusy E. An improved in vitro bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse Leydig cell preparations // Acta endocrinol. — 1974. — 77. — P. 655—663.
11. Dignan N.M., Shaw R.W., Rudd B.T. et al. Sex hormone levels and gonadotropin release in the polycystic ovary syndrome // Clin. Endocrinol. — 1975. — 4. — P. 287—295.
12. Jones H.M., Vernon M.W., Rush M.E. Systematic studies invalidate the neonatally androgenized rat as a model for polycystic ovary disease // Biol. Reprod. — 1987. — 36. — P. 1253—1265.
13. Halasz B., Gorski R. Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus // Endocrinology. — 1967. — 80. — P. 608—622.
14. Harms P., Ojeda S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein // J.Appl. Physiol. — 1974. — 36. — P. 391—392.
15. Labrie F., Lagace L., Ferland L. New aspects of the control of pituitary hormone secretion // Ann. Clin. Res. — 1978. — 10. — 109—119.
16. Loke D.F.M., Ratnam S.S., Goh H.H. Luteinizing hormone surge in adult female rats after androgen priming // J.Neuroendocrinol. — 1992. — 4. — P. 211—216.
17. Rosello C.E., Resko J.A. Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism // Endocrinology. — 1984. — 114. — P. 2183—2189.
18. Reznikov A.G., Akmayev I.G., Fidelina O.V. et al. Aromatase activity in some areas of rat foetus brain // Neuroendocrinol. Lts. — 1989. — 11. — P. 189—193.

Ін-т ендокринології та обміну речовин
ім. В.П.Комісаренка АМН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 23.05.94