

Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин,
О.В. Сачинська, І.Ю. Ганжий, О.Г. Резніков

Гормональні зміни у самиць щурів при дії хронічного стресу та надлишку андрогенів у період статевого дозрівання

Досліджено зміни базального вмісту кортикостерону, тестостерону та андростендіону в плазмі крові, а також їх реакцію на гострий дозований стрес (30-хвилинна іммобілізація) у самиць щурів віком 35, 40 і 45 діб, які зазнавали впливу хронічного стресу (щодобова 30-хвилинна іммобілізація з 35-ї по 45-ту добу життя) та/або надлишку екзогенних андрогенів (імплантація капсул з тестостероном під шкіру щурам на 33-тю добу життя) в пубертатний період. Контрольні та дослідні самиці всіх вікових груп реагували на гострий стрес вірогідним підвищенням вмісту кортикостерону. При цьому в самиць з гіперандрогенією віком 45 діб наприкінці хронічного стресування ступінь активації надниркових залоз у відповідь на гострий дозований стрес зменшувався, а в стресованих – поступово підвищувався. Вміст тестостерону в плазмі крові після гострого стресу знижувався у 35-добових контрольних самиць і зростав – у тварин з гіперандрогенією того самого віку на тлі десятиразового підвищення базального рівня гормону. У контрольних самиць віком 40 діб, а також в тварин з гіперандрогенією, що зазнавали впливу хронічного стресу впродовж 5 діб, гострий дозований стрес не викликав вірогідних змін вмісту тестостерону в плазмі крові, водночас підвищував вміст андростендіону. У стресованих самиць 40-добового віку на тлі підвищеної базальної секреції андростендіону реакція гормону на гострий стрес не змінювалась, а тестостерону – вірогідно зменшувалася. Наприкінці пубертатного періоду у контрольних і дослідних тварин віком 45 діб вміст тестостерону в плазмі крові у відповідь на гострий дозований стрес не змінювався, проте зменшувався у стресованих самиць і зростав на тлі підвищеної базальної секреції гормону в щурів з гіперандрогенією, що зазнавали впливу хронічного стресу. Зроблено висновок про можливий функціональний зв'язок між змінами гормонального гомеостазу в пубертатний період та розвитком порушень репродуктивної системи у тварин при досягненні статевої зрілості.
Ключові слова: хронічний стрес, надлишок андрогенів, стероїдні гормони, статеве дозрівання, самиці щурів.

ВСТУП

Період статевого дозрівання характеризується суттєвою гормональною перебудовою організму та формуванням певного статевого фенотипу. В цей час порушення гормонального гомеостазу можуть призвести до розвитку різноманітних розладів репродуктивної системи, в тому числі й синдрому полікістозних яєчників (СПКЯ). Ризик виникнення останнього посилюється фізіологічним підвищенням продукції андрогенів наднирковими залоза-

ми, нестійкістю цирхорального ритму гонадотропінів, гіпопрогестеронемією, гіперінсулінемією та іншими гормональними чинниками [6, 10, 14, 20]. Ці зміни відбуваються на тлі вегетативної лабільності та напруження адаптаційно-компенсаторних можливостей організму, що сприяє підвищенню його чутливості до дії стресу в пубертатний період [7, 16–18]. Натомість питання щодо ролі стресового чинника в механізмах формування СПКЯ досі залишається нез'ясованим. У наших попередніх дослідженнях було показано,

© Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин, О.В. Сачинська, І.Ю. Ганжий, О.Г. Резніков

що хронічне стресування самиць шурів пубертатного віку на тлі надлишку екзогенних андрогенів призводить до затримки статевого дозрівання, а також до збільшення кількості оваріальних кіст в яєчниках тварин при його досягненні [3]. Ми припустили, що зазначені порушення репродуктивної функції мають певний зв'язок із змінами гормонального статусу за умов тривалої дії стресу в пубертатний період.

Мета нашої роботи – вивчити зміни базальної та стресової секреції стероїдних гормонів у самиць шурів за умов дії хронічного стресу та/або надлишку андрогенів у період статевого дозрівання.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 100 білих щурах-самицях лінії Вістар з датованим народженням (день народження вважали за першу добу життя). Тварин утримували в однакових умовах віварію, на стандартному раціоні харчування та вільному доступі до питної води. Всі експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей [4].

Стан гіперандрогенії у самиць шурів пубертатного віку відтворювали описаним раніше способом [5], тобто підшкірною імплантацією силастикових капсул з кристалічним тестостероном ("Fluka", Швейцарія). Імплантацію капсул з тестостероном (5 мг) під шкіру шиї здійснювали тваринам у віці 33 діб (n=50) під легким ефірним наркозом. Перед імплантацією капсули преінкубували у фізіологічному розчині, забуференому 0,15 моль/л фосфатним буфером (рН 7,2) протягом 48 год при 37 °С. Через дві доби після імплантації капсул частина тварин з гіперандрогенією (n=20) була піддана іммобілізаційному стресуванню протягом 30 хв щодобово з 35-ї по 45-ту добу життя, що охоплює пубертатний період у шурів. Окрему групу становили самиці, які у той самий період зазнавали

впливу хронічного стресу (n=20). Контрольну групу формували з псевдооперованих тварин (n=30). Знеживлення тварин у віці 35, 40 і 45 діб проводили швидкою декапітацією під легким ефірним наркозом до та після гострого дозованого стресу (30-хвилинна іммобілізація). Кров збирали у гепаринізовані пробірки, центрифугували для відокремлення плазми і зберігали останню при -18 °С для наступного аналізу вмісту кортикостерону, тестостерону та андростендіону.

Вміст кортикостерону в плазмі крові визначали флюориметричним мікрометодом [1], тестостерону та андростендіону в плазмі крові – радіоімунологічним методом з використанням наборів "RIA Testosterone direct" і "RIA Androstenedione" ("Immunotech", Франція). Радіоактивність зразків вимірювали на γ-лічильнику 5500-B ("Beckman", США). Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента та критерію U Вілкоксона-Манна-Уїтні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку експерименту в самиць контрольної групи віком 35 діб (n=10) після гострого дозованого стресу спостерігалось вірогідне підвищення вмісту кортикостерону в плазмі крові з $824,4 \pm 24,2$ до $1069,4$ нмоль/л $\pm 39,4$ нмоль/л у порівнянні з базальним рівнем ($P < 0,001$). У самиць того самого віку, але з надлишком андрогенів (n=10) на тлі вірогідно нижчого (на 54 %) базального рівня кортикостерону реакція на гострий стрес була ще виразнішою – вміст гормону підвищувався майже втричі: з $445,1 \pm 39,2$ до $1299,8$ нмоль/л $\pm 43,5$ нмоль/л ($P < 0,001$).

Самиці контрольної та усіх дослідних груп віком 40 діб також реагували на гострий стрес вірогідним підвищенням вмісту кортикостерону (табл. 1). При цьому у самиць контрольної групи амплітуда стресової реак-

Таблиця 1. Зміни вмісту кортикостерону (нмоль/л) у плазмі крові самиць щурів пубертатного віку впродовж хронічного стресування (M ± m; n=5)

Групи тварин	Вік тварин, доби			
	40		45	
	базальний рівень	після гострого стресу	базальний рівень	після гострого стресу
Контроль	668,3±62,4	1698,8±98,4*	689,7±84,4	1247,9±59,8 *
Щури з гіперандрогенією	1071,2±84,8**	1677,3±30,1*	731,9±46,1	1223,6±122,1*
Стресовані щури	929,9±122,9	1398,9±31,0*,**,***	592,2±56,8	1164,1±25,2*
Щури з гіперандрогенією, що зазнавали дії хронічного стресу	757,6±41,6***	1410,9±46,4*,**,***	979,5±109,1	1442,4±43,4*,**,****

Примітки. Тут і в табл. 2 *P<0,05 порівняно з базальним рівнем гормону у відповідній групі тварин, **P<0,05 порівняно з контролем, ***P<0,05 порівняно з групою тварин з гіперандрогенією, ****P<0,05 порівняно з групою стресованих тварин.

ції була суттєво більшою, ніж у тварин усіх інших груп: концентрація кортикостерону в плазмі крові підвищилась у них в 2,5 раза щодо 1,6, 1,5 і 1,9 раза у щурів з гіперандрогенією, стресованих і андрогенізованих, що зазнавали хронічного стресу відповідно.

Майже такі самі закономірності щодо стресової реакції кортикостерону та ступеня її виразності спостерігались і у тварин усіх досліджуваних груп віком 45 діб. Слід відмітити, що впродовж 10-добового стресування самиць щурів ступінь активації надниркових залоз у відповідь на 30-хвилинну іммобілізацію поступово підвищувався на 30, 50 і 96 % у тварин віком 35, 40 і 45 діб відповідно. Ці спостереження свідчать про досить високу реактивність самиць щурів пубертатного віку, яка зумовлена підвищеною чутливістю надниркових залоз до стресових чинників, зокрема до адренкортикотропного гормону (АКТГ) [8]. У самиць з надлишком андрогенів наприкінці хронічного стресування глюкокортикоїдна активність за умов гострого стресу, навпаки, зменшувалася, що може бути пов'язано з пригнічувальною дією тестостерону на функцію гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи (ГГАС) [11].

Показано, що контрольні та дослідні тварини віком 35 діб реагували на гострий дозований стрес вірогідними, проте діа-

метралью протилежними, змінами вмісту тестостерону. Так, якщо у контрольних самиць він знизився в 4 рази з 0,92±0,24 до 0,23 нмоль/л ± 0,05 нмоль/л (P<0,05), то в тварин з гіперандрогенією спостерігалось у середньому 1,4-кратне зростання цього показника з 9,03±2,99 до 13,08 нмоль/л ± 3,08 нмоль/л (P<0,05). Слід також зазначити, що вихідний вміст тестостерону в крові самиць цих двох груп відрізнявся майже вдесятеро і був цілком закономірно вищим у тварин з гіперандрогенією, що пов'язано з надходженням цього гормону з імплантованих капсул до судинного русла.

Гостре стресування контрольних і дослідних, підданих дії хронічного стресу впродовж 5 діб, самиць віком 40 діб не викликало вірогідних змін вмісту тестостерону, водночас підвищувало вміст андростендіону в плазмі крові тварин досліджуваних груп з 0,52±0,09 до 1,24 нмоль/л ± 0,12 нмоль/л та з 1,58±0,02 до 2,43 нмоль/л ± 0,20 нмоль/л відповідно (P<0,05). Як відомо [15], посилена секреція андростендіону у самиць за умов гострого стресу зумовлена стимулювальним впливом АКТГ на сітчасту зону кори надниркових залоз. Варто зазначити, що в самиць з надлишком андрогенів, що зазнавали впливу хронічного стресу, на тлі підвищеного базального вмісту андростендіону в плазмі крові

амплітуда гормональної реакції на гострий дозований стрес була меншою, ніж у контрольних тварин. У стресованих впродовж 5 діб самиць щурів 40-добового віку підвищення базальної секреції андростендіону було цілком очікуваним і пов'язано з активацією біосинтезу андрогенів надниркових залоз під впливом глюкокортикоїдів у статевонезрілих тварин [2]. Разом з тим у самиць цієї групи була відсутня реакція андростендіону на гострий дозований стрес: базальний вміст – 2,87 нмоль/л \pm 0,57 нмоль/л, після гострого стресу – 2,43 нмоль/л \pm 0,20 нмоль/л. Це може свідчити про певне функціональне виснаження надниркових залоз внаслідок хронічного стресу. Базальний вміст тестостерону в плазмі крові цих тварин не змінювався, а стресова реакція гормону – вірогідно зменшувалася (в 3,4 раза; $P < 0,01$; табл.2).

У 45-добових самиць контрольної групи, як і в самиць з гіперандрогенією, вміст тестостерону суттєво не змінювався у відповідь на дозований гострий стрес (табл. 2). На відміну від цього, в стресованих і у тварин з надлишком андрогенів, підданих дії хронічного стресу впродовж 10 діб, вміст досліджуваного гормону в крові вірогідно змінювався: у стресованих самиць зменшувався в 4,5 раза ($P < 0,01$), а в щурів з надлишком андрогенів, підданих хронічному стресу – зростав в 1,8 раза ($P < 0,05$).

Впродовж експерименту у тварин усіх груп відмічено зміни базального вмісту те-

стостерону в крові. У самиць контрольної групи поступово знижувався вміст гормону з досягненням рівня вірогідності на 45-ту добу життя (в 4,4 раза). У тварин з гіперандрогенією цей показник знизився в той самий термін у 4,2 раза. Стресовані самиці та тварини з надлишком андрогенів, піддані хронічному стресу, на 45-ту добу мали підвищений (в 2 і 1,8 раза відповідно) вміст гормону у порівнянні з 40-добовими тваринами цих самих груп, проте ці зміни не сягали ступеня вірогідності.

При аналізі отриманих результатів особливо слід відмітити те, що хронічне стресування самиць з гіперандрогенією додатково підвищує базальний вміст тестостерону на 45-ту добу життя, тобто наприкінці пубертатного періоду. Підвищення після гострого стресу цього показника у тварин з надлишком андрогенів 35-добового віку та віком 45 діб, які зазнавали впливу хронічного стресу, скоріш за все пов'язано зі стресовим гальмуванням метаболізму та елімінації андрогенних стероїдів. Підвищена андрогенна насиченість організму стресованих самиць може пояснити отримані нами раніше дані про посилення утворення кіст в яєчниках та затримку статевого дозрівання у тварин з надлишком андрогенів [3]. Певну роль у розвитку порушень репродуктивної функції можуть також відігравати стресові чинники, насамперед глюкокортикоїди, опіоїди, які вивільнюються внаслідок стресової акти-

Таблиця 2. Зміни вмісту тестостерону (нмоль/л) у плазмі крові самиць щурів пубертатного віку впродовж хронічного стресування ($M \pm m$; $n=5$)

Групи тварин	Вік тварин, доби			
	40		45	
	базальний рівень	після гострого стресу	базальний рівень	після гострого стресу
Контроль Щури з гіперандрогенією	0,44 \pm 0,10	0,87 \pm 0,18	0,21 \pm 0,05	0,59 \pm 0,31
Стресовані щури Щури з гіперандро- генією, що зазнавали дії хронічного стресу	3,52 \pm 0,66**	8,09 \pm 3,56**	2,12 \pm 0,46**	3,63 \pm 0,68**
Стресовані щури Щури з гіперандро- генією, що зазнавали дії хронічного стресу	1,04 \pm 0,26	0,30 \pm 0,06*, **, ***	2,06 \pm 0,51**	0,46 \pm 0,13*, ***
	2,43 \pm 0,48 **, ****	2,34 \pm 0,33 **, ****, *****	4,41 \pm 0,32 **, ****, *****	7,73 \pm 1,18 *, **, ****, *****

вації ГГАС і здійснюють гальмівний вплив на секрецію ендогенних гонадотропних і оваріальних гормонів [9, 12, 13, 19].

Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин, О.В. Сачинская, И.Ю. Ганжий, А.Г.Резников

ГОРМОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У САМОК КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА И ИЗБЫТКА АНДРОГЕНОВ В ПЕРИОД ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ

Исследована динамика базального содержания кортикостерона, тестостерона и андростендиона в плазме крови, а также их реакции на острый дозированный стресс (30-минутная иммобилизация) у самок крыс в возрасте 35, 40 и 45 сут, которые подвергались воздействию хронического стресса (ежедневная 30-минутная иммобилизация с 35-х по 45-е сутки жизни) и/или избытка экзогенных андрогенов (подкожная имплантация капсул с тестостероном крысам на 33-и сутки жизни) в пубертатный период. Контрольные и подопытные самки всех возрастных групп реагировали на острый стресс достоверным повышением содержания кортикостерона в плазме крови. При этом у самок с гиперандрогенией 45-суточного возраста в конце хронического стрессирования степень активации надпочечных желез в ответ на острый дозированный стресс снижалась, а у стрессированных – постепенно повышалась. Концентрация тестостерона в плазме крови после острого стресса снижалась у контрольных самок 35-суточного возраста и возрастала – у животных с гиперандрогенией того же возраста на фоне десятикратного повышения базального уровня гормона. У контрольных самок в возрасте 40 сут, а также животных с избытком андрогенов, подвергшихся воздействию хронического стресса в течение 5 сут, острый дозированный стресс не вызывал достоверных изменений этого показателя, одновременно повышал содержание андростендиона. У стрессированных самок 40-суточного возраста на фоне повышенной базальной секреции андростендиона реакция гормона на острый стресс не изменялась, а тестостерона – достоверно уменьшалась. В конце пубертатного периода (на 45-е сутки жизни) содержание тестостерона в плазме крови в ответ на острый дозированный стресс не изменялось у контрольных самок и у животных с избытком андрогенов, однако уменьшалось у стрессированных самок и возрастало на фоне повышенной базальной секреции гормона у крыс с гиперандрогенией, испытавших хронический стресс. Сделан вывод о возможной функциональной связи между изменениями гормонального гомеостаза в пубертатный период и развитием нарушений репродуктивной системы у животных при достижении возраста половой зрелости. Ключевые слова: хронический стресс, избыток андрогенов, стероидные гормоны, половое созревание, самки крыс.

N.D. Nosenko, L.V. Tarasenko, P.V. Sinitsyn, O.V. Sachinskaya, I.Yu. Ganzhiy, A.G. Reznikov

THE DYNAMICS OF HORMONAL CHANGES IN FEMALE RATS EXPOSED TO CHRONIC STRESS AND ANDROGEN EXCESS DURING PUBESCENCE

The dynamics of blood plasma corticosterone, testosterone and androstenedione levels and their reaction to acute stress (30 min immobilization) in 35-, 40- and 45-day old female rats exposed to chronic stress (daily 30-min immobilization from 35th to 45th day of life) and/or to excess of exogenous androgens (implantation of capsules with testosterone to 33-day old animals) during pubescence was studied. Both control and experimental females in all age groups responded to acute stress by significant elevation of blood plasma corticosterone levels. At the end of the chronic stress session, the extent of adrenals activation in response to acute dosed stress was lowered in androgenized 45-day old females and increased gradually in stressed ones. After acute stress, the blood plasma testosterone level decreased in control 35-day old females and rose – in androgenized females against 10-fold rising of basal hormonal level. In 40-day old control females as well as in androgenized ones exposed to chronic stress during 5 days, the acute dosed stress did not result in significant changes of blood plasma testosterone and elevated blood plasma androstenedione. Stressed 40-day old females with increased basal androstenedione secretion did not respond to acute stress by the hormone level changes while blood plasma testosterone declined significantly. At the end of pubescence (on the 45th day of life), acute stress did not affect the blood plasma testosterone level in control and androgenized animals, while decreased it in stressed females and increased – in androgenized rats exposed to chronic stress against elevated basal level of the hormone. The conclusion is made about possible functional relationship between the changes in hormonal homeostasis during pubescence and development of reproductive system in mature animals.

Key words: chronic stress, androgen excess, pubescence, steroid hormones, female rats.

V.P. Kommissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;

Zaporozhye State Medical Academy for Postgraduate Education, Zaporozhye

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балашов Ю. Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостерона: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – 76, № 2. – С. 280–283.
2. Бутнев В.Ю., Гончаров Н.П. Стимулирующее действие глюкокортикоидов на биосинтез адриналовых андрогенов у неполовозрелых обезьян // Тез. докл.

- Междунар. симп. «Физиология гипофизарно-адрено-кортикальной системы». – 1990. – С. 48–49.
3. Носенко Н.Д., Ганжий І.Ю., Сініцин П.А., Полякова Л.І., Тарасенко Л.В., Лимарєва А.А., Чайковська Л.В., Сачинська О.В., Резніков О.Г. Вплив хронічного стресу в пубертатний період на репродуктивну систему самиць щурів з експериментальною гіперандрогенією // Фізіол. журн. – 2011. – **57**, № 2. – Р. 27–34.
 4. Резніков О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – **8**, № 1. – С. 142–145.
 5. Резніков О.Г., Сініцин П.В., Тарасенко Л.В., Полякова Л.І. Нейроендокринні механізми розвитку ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження у щурів // Фізіол. журн. – 1995. – **41**, № 5-6. – С. 33-37.
 6. Чеботарева Ю.Ю. Механізми формування синдрому поликістозних яєчників в періоді полового созрівання, клінічне течення, профілактика і лічення // Міжнар. ендокринол. журн. – 2011. – **38**, № 6. – С. 105–114.
 7. Charmandari E., Kino T., Souvatzoglou E., Chrousos G.P. Pediatric stress: hormonal mediators and human development // Horm. Res. – 2003. – **59**, № 4. – Р. 161–179.
 8. Chrousos G.P., Torpy D.J., Gold P.W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications // Ann. Intern. Med. – 1998. – **129**, № 3. – Р. 229–240.
 9. Eyvazzadeh A.D., Pennington K.P., Pop-Busui R., Sowers M., Zubieta J.K., Smith Y.R. The role of the endogenous opioid system in polycystic ovary syndrome // Fertil. Steril. – 2009. – **92**, № 1. – Р. 1–12.
 10. Greiner M., Paredes A., Araya V., Lara H.E. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome // Endocrine. – 2005. – **28**, № 3. – Р. 319–324.
 11. 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. – **87**, № 3. – Р. 455–461.
 12. Laatikainen T.J. Corticotropin-releasing hormone and opioid peptides in reproduction and stress // Ann. Med. – 1991. – **23**, № 5. – Р. 489–496.
 13. MacFarland L.A., Mann D.R. The inhibitory effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats // Biol. Reprod. – 1977. – **16**. – Р. 306–314.
 14. Marouliss G.B., Triantafillidis I.K. Polycystic ovarian disease: the adrenal connection // Pediatr. Endocrinol. Rev. – 2006. – Suppl 1. – Р. 205–207.
 15. Moran C., Azziz R. The role of the adrenal cortex in polycystic ovary syndrome // Obstet. Gynecol. Clin. North Am. – 2001. – **28**, № 1. – Р. 63–75.
 16. Romeo R.D. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity // Front. Neuroendocrinol. – 2010. – **31**, № 2. – Р. 232–240.
 17. Romeo R.D., Lee S.J., McEwen B.S. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats // Neuroendocrinology. – 2004. – **80**, № 6. – Р. 387–393.
 18. Teran Davila J., Terra-Garran A.D. Polycystic ovary syndrome of extra-ovarian origin. Review // Invest. Clin. – 2001. – **42**, №1. – Р. 51–78.
 19. Whirledge S., Cidlowski J. A. Glucocorticoids, stress, and fertility // Minerva Endocrinol. – 2010. – **35**, № 2. – Р. 109–125.
 20. Young E.A., Altemus M. Puberty, ovarian steroids, and stress // Ann N Y Acad Sci. – 2004. – **1021**. – Р. 124–133.

ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;
 ДУ “Запорізька академія післядиплом. освіти МОЗ України”
 E-mail: reprod@i.com.ua

Матеріал надійшов
 до редакції 10.01.2012