

Л. Б. Літвінова

Функціональна активність яєчників «андрогенізованих» щурів під час статевого дозрівання

В експерименте на крысах, которым в препубертате вводили ингибитор ароматазы или дигидротестостерон (ДГТ), установлено, что повышение уровня андрогенов в крови стимулирует овариальный фолликулогенез на ранних его стадиях. ДГТ эффективнее тестостерона ускоряет рост малых фолликулов. Андрогены, особенно ДГТ (7 мкг/100 г), тормозят созревание преовуляторных фолликулов, превращая их в атретические. Угнетение функциональной активности яичников отодвигает или полностью блокирует первую овуляцию в процессе пубертации крыс.

Вступ

Головним у статевому дозріванні є посилення активності яєчників [1, 26]. Пубертатний період характеризується кількісними та якісними змінами у фолікулярному апараті та спектрі оваріальних стероїдів, підвищенням чутливості яєчників до дії гонадотропінів, завершенням формування прямих і зворотних зв'язків у системі гіпоталамус – гіпофіз – гонади [3, 9]. Принципова умова дії цього механізму – наявність в організмі певних концентрацій статевих стероїдів, зокрема естрогенів і андрогенів [4]. Синтез оваріальних андрогенів відбувається у клітинах з високою активністю ферменту 17 α -гідроксилази (клітини теки, строми, інтерстиціальної тканини) під контролем лютеїнізуючого гормону (ЛГ). З андрогенних попередників (тестостерону й андростендіону) за допомогою ферменту ароматази у клітинах гранульози фолікулів, що дозрівають, утворюються естрогени (естрадіол і естрон) під впливом фолікулостимулюючого гормону [9, 11, 21]. Другим шляхом метаболізму андрогенів є біотрансформація тестостерону (під дією ферменту 5 α -редуктази) у 5 α -відновлені андрогени – дигідротестостерон (ДГТ) та надалі у андростендіоли [4, 5, 11]. Ці андрогени не здатні до ароматизації.

Оваріальні стероїди акумулюються у внутрішньофолікулярній рідині, а співвідношення естрогенів і андрогенів в останній визначає «частку» фолікулів, що дозрівають, – подальший їх розвиток (збільшення естрогенів) або атрезію (переважність андрогенів) [1, 3, 9, 26]. З іншого боку, гонадальна секреція стероїдів спричиняє зміни гормонального фону у загальній циркуляції протягом пубертатогенезу. Дозрівання жіночої статевої системи пов'язують зі збільшенням вмісту естрогенів у крові [1, 3, 9, 26], а гіперандрогенію розглядають як негативний фактор пубертації [8, 13]. Не існує єдиної думки щодо участі андрогенів, які не ароматизуються, у регуляції статевого дозрівання жіночого організму. До того ж, синтез цих андрогенів може відбуватися не лише в яєчниках, але й в інших органах і клітинах, в

© Л. Б. Літвінова

яких зареєстровано високу активність 5 α -редуктази [4, 11]. Звідси, підвищення вмісту андрогенів у периферичній крові, зі свого боку, може впливати на функцію яєчників протягом пубертації.

Мета нашого дослідження — вивчити наслідки препубертатної гіперандрогенії на генеративну й ендокринну функцію яєчників щурів.

Методика

Дослідження проведено на 78 статевонезрілих самицях щурів лінії Вістар. У тварин препубертатного віку (на 35-ту добу) моделювали гіперандрогенію двома шляхами. Введенням інгібітора ароматази — 4-гідроксиандростендіону (4-ОН-А, у дозі 5 мг/100 г) [18] створювали в організмі умови нестачі естрогенів. Це передбачало зсув співвідношення естрогенів і андрогенів у бік останніх. Ін'єкцією екзогенного ДГТ (у дозі 7 мкг/100 г) досягали підвищення вмісту 5 α -відновлених андрогенів у крові.

Андроген або інгібітор ферменту, які синтезовані в УкрНДІФЕЗ, вводили одноразово внутрішньом'язово в олійному розчині. Контрольні щури отримували розчинник стероїдів (кісточкову олію) за аналогічних умов.

У самиць 40-добового віку, який відповідає початковому етапу фізіологічної пубертації [6], вивчали функцію яєчників. На серійних гістологічних зрізах гонад (у кожному п'ятому зрізі) диференціювали і підраховували кількість оваріальних фолікулів, які знаходилися на різних стадіях фолікулогенезу [10]. Ендокринну функцію гонад оцінювали за вмістом статевих стероїдів (тестостерону й естрадіолу) у периферичній крові самиць радіоімунологічним методом. Крім того контролювали функцію гіпофіза: визначали вміст сумарних гонадотропінів у гомогенатах гіпофізів методом біологічного тестування [23].

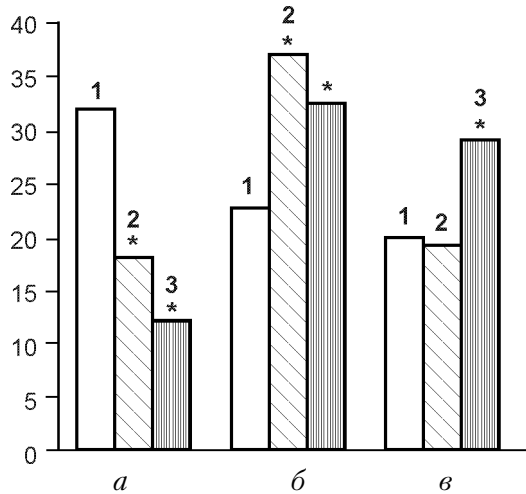
Частину щурів з кожної групи залишали до статевого дозрівання, яке оцінювали за строком відкриття піхви (початкова фаза) та настанням першої овуляції (завершальна фаза). Про останню судили за наявністю еструсу (тічки) у вагінальних мазках, які аналізували щодобово після відкриття піхви.

Результати та їх обговорення

Статеве дозрівання контрольних щурів і самиць, яким вводили 4-ОН-А, відбувалося у 100 % випадках. Після ін'єкції ДГТ знижувалася (на 43,3 %) кількість щурів у групі з ознаками завершення пубертації, тобто настанням першої овуляції. У решти самиць цієї групи період між відкриттям піхви й овуляцією не відрізнявся від такого у контролі. У щурів, оброблених 4-ОН-А, цей період значно подовжувався (до $30,40 \pm 6,44$ проти $12,11 \pm 2,27$ доби у контролі; $P < 0,02$), що свідчило про затримку першої овуляції. Серед причин, які затримують чи блокують овуляцію, може бути недостатність функції яєчників (зниження естрогенної секреції чи пригнічення фолікулогенезу) або гіпофіза (гальмування синтезу чи секреції гонадотропінів).

Результати вивчення оваріального фолікулогенезу у щурів 40-добового віку наведено на рис. 1. У гонадах контрольних самиць основна маса фолікулів належала до категорії примордіальних. Співвідношення числа

Рис. 1. Стан фолікулярного апарату яєчників 40-добових щурів після введення у препубертаті інгібітора ароматази або дигідротестостерону (ДГТ): а – примордіальні фолікули; б – фолікули, що зростають; в – атретичні фолікули і тіла; 1 – контроль, 2 – 4-гідроксиандростендіон, 3 – ДГТ. * $P < 0,05 - 0,0001$.



фолікулів, що зростали, до кількості атретичних тіл становило $1,36 \pm 0,23$, тобто процес розвитку фолікулів мав переваги над їх атрезією.

У щурів, яким вводили 4-ОН-А (II група) або ДГТ (III група), пул примордіальних фолікулів спустошувався на 43,7 та 62,5 % відповідно. Зниження кількості цих фолікулів в обох дослідних групах супроводжувалося збільшенням числа фолікулів, що зростали. Разом з тим розподіл фолікулів за стадіями їх дозрівання у щурів різних дослідних груп мав принципові відмінності. Після введення 4-ОН-А (II група) збільшувалася кількість усіх видів фолікулів: преантральних (на 52,5 %), багатопорожнинних (на 70,0 %) і однопорожнинних (на 104,2 %), тобто спостерігалася стимуляція фолікулогенезу на різних його стадіях. Число атретичних тіл у гонадах контрольних і дослідних самиць II групи не відрізнялось, а співвідношення числа фолікулів, що зростали, до атретичних тіл у дослідній групі ($2,39 \pm 0,24$) було вірогідно ($P < 0,01$) вищим, ніж у контролі.

В яєчниках щурів, яким вводили ДГТ (III група), після суттєвого зниження числа примордіальних фолікулів (див. рис. 1), на відміну від результатів у самок II групи, кількість преантральних фолікулів ($13,8 \pm 1,23$) залишалася на рівні контрольних значень ($12,10 \pm 1,17$). Однією з причин такого неузгодження могла бути підсилена фолікулярна атрезія, але остання у фолікулах до появи у них порожнини (атруму) настає дуже рідко [12]. У гонадах щурів III групи значно збільшувалася (на 77,1 %) кількість багатопорожнинних фолікулів, що дає можливість припустити думку про прискорення дозрівання фолікулів зі стадії таких, які вступили у розвиток, до стадії малих антральних за умов введення ДГТ. Ці результати узгоджуються з даними авторів [17], які відзначали індукцію фолікулярного розвитку після збільшення рівня ДГТ у циркуляції. Однак стимульований андрогеном розвиток багатопорожнинних фолікулів частково припинявся. Про те свідчили, з одного боку, істотне підвищення (на 45,9 %) кількості атретичних тіл, а з іншого, — незначне збільшення числа однопорожнинних фолікулів (контроль — $1,20 \pm 0,12$; III група — $1,70 \pm 0,18$) у гонадах самиць (див. рис. 1). Отже, в яєчниках щурів після введення ДГТ, на відміну від самиць II групи, малі антральні фолікули посилено піддава-

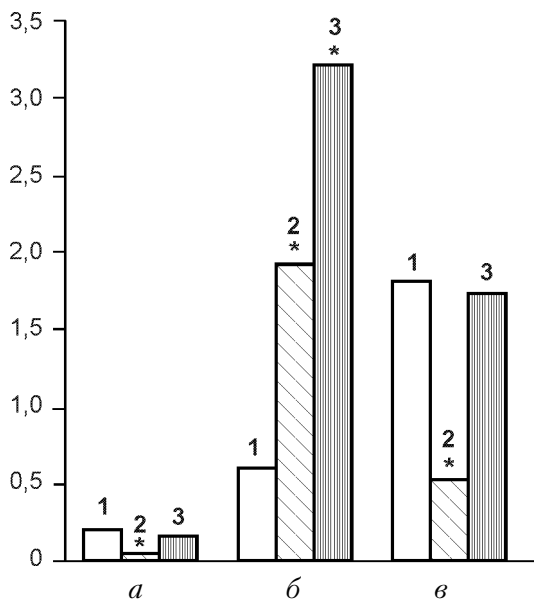


Рис. 2. Гормональний стан 40-добових самиць щурів, у яких у препубертаті моделювали гіперандрогенію: а – концентрація естрадіолу у крові (нмоль/л); б – концентрація тестостерону у крові (нмоль/л); в – вміст гонадотропінів у гіпофізі (ум.од.) *P < 0,05 – 0,001.

лись атретичним перетворенням. Слід зазначити, що у гонадах дослідних самиць II і III груп не виявлено однопорожнинних фолікулів, які за розміром класифікують [12] як преовуляційні. Тобто в обох випадках (введення 4-ОН-А чи ДГТ) однопорожнинні фолікули, ймовірно, піддавались атрезії, принаймні у цьому віці.

Результати гормонального обстеження дослідних щурів наведено на рис. 2. Концентрація естрогенів у периферичній крові самиць, як і передбачалося [18], значно знижувалася після ін'єкції 4-ОН-А, але залишалася на рівні контрольних величин після введення ДГТ. Підвищення концентрації андрогенів у крові щурів II (у 3,1 раза) і III груп (у 5,0 разів) могло сприяти підвищенню вмісту і тестостерону, і ДГТ, оскільки у радіоімунологічних наборах при визначенні концентрації тестостерону з антисироваткою зв'язується до 20–31% ДГТ [20]. За умов введення ДГТ андрогенізація самиць, найпевніше, відбувалася за рахунок екзогенного гормону. Тоді як блокування процесу ароматизації андрогенів у щурів II групи могло спричинити накопичення тестостерону та/або зсув його метаболізму (під дією 5 α -редуктази) у бік збільшення вмісту ДГТ. Раніше було встановлено негативну кореляційну залежність активності 5 α -редуктази, а відповідно і вмісту ДГТ, та маси матки у статевонезрілих щурів [16]. За нашими результатами, маса матки у щурів, яким вводили 4-ОН-А (70,50 мг/100 г \pm 3,86 мг/100 г), не відрізнялася від такої у контролі (66,44 мг/100 г \pm 2,02 мг/100 г). Ці результати безпосередньо свідчать про низьку активність ферменту та дають підстави вважати, що у щурів II групи джерелом андрогенізації більшою мірою був тестостерон. Тоді як зниження маси матки до 53,99 мг/100 г \pm \pm 4,59 мг/100 г після введення ДГТ (III група) підтверджує збільшення його рівня у циркуляції. Важливо відмітити, що співвідношення андрогенів до естрогенів у щурів II і III груп не мали вірогідної різниці, але більше ніж у 10 разів перевищували контрольне значення (2,93 \pm 0,34).

Отже, у щурів з таким гормональним фоном спостерігалася стимуляція початкових і пригнічення завершальних етапів фолікугенезу. Разом з тим фактори, які запускають клональну експансію клітин гранульози, що спричиняє активацію примордіальних фолікулів (див. рис. 1), нині невідомі. Вважають, що вони належать до внутрішньояєчникових стимулів [2], а сигнал до ініціації розвитку примордіальних фолікулів, імовірно, надходить з їх ооцитів [15], які активно синтезують РНК [25]. Андрогени, підвищення вмісту яких відзначалось у крові дослідних самиць (див.рис. 2), стимулюють синтез РНК [7], що, в свою чергу, можливо, підсилює “сигнал” до ініціації, запуску фолікулярного розвитку.

До численних факторів, які впливають на швидкість проліферації клітин фолікулів середнього розміру, належать гормональні чинники (статеві стероїди, гонадотропіни). У дослідах на “гіпофізектомованих” щурах доведено стимуляцію зросту фолікулів до утворення у них атруму [14]. Тоді як формування порожнини у фолікулах відбувається під контролем ФСГ [2], рецептори до якого з’являються ще на стадії преантральних фолікулів [27].

За умов нашого експерименту після введення 4-ОН-А (II група) вміст естрогенів знижувався (див. рис. 2). Це означає, що у стимуляції початкових етапів фолікулогенезу брали участь андрогени, а також, імовірно, і ФСГ, що призводило до збільшення кількості малих антральних фолікулів. У самиць цієї групи сумарний вміст гонадотропінів у гіпофізі порівняно з контролем зменшувався на 72,2 % (див.рис. 2), що могло бути наслідком пригнічення їх синтезу або, навпаки, посиленням гонадотропної секреції. Активність гіпофіза з боку гонад регулюється стероїдами за механізмом зворотного зв’язку, який починає діяти до статевого дозрівання [3, 26]. Зниження вмісту естрогенів після введення інгібітора ароматази, ймовірно, за цим механізмом спричиняло визволення ФСГ, що призводило до зменшення його вмісту у гіпофізі (див. рис. 2), а підвищення рівня ФСГ у циркуляції стимулювало появу антральних фолікулів (див. рис. 1).

Після введення ДГТ стимуляція фолікулогенезу відбувалася під впливом самого андрогену [17], а також не виключено, що і ФСГ, оскільки за даними літератури [22, 24] щодо дії ДГТ на секрецію цього гонадотропіну, єдиної думки немає. Однак відомо [9, 26], що ДГТ є природним інгібітором ароматази і без гонадотропного втручання гальмує секрецію естрогенів. У нашому досліді не зареєстровано зменшення вмісту естрогенів у щурів III групи (див. рис. 2), що дає підстави для припущення про підтримку секреції естрогенів, а також фолікулогенезу з боку ФСГ. Однак ДГТ знижує зв’язування цього гонадотропіну з клітинами гранульози фолікулів [19], спричиняючи їх атрезію (див. рис. 1).

Дозрівання однопорожнинних фолікулів до стадії преовуляційних більшою мірою залежить від вмісту ЛГ [2, 12]. Відсутність у гонадах самиць обох дослідних груп дозрілих Граафових фолікулів може безпосередньо вказувати про недостатність секреції цього гонадотропіну, при тому більшою мірою у випадках андрогенізації, викликаній ДГТ, оскільки у цих щурів число атретичних тіл перевищувало таке в інших групах.

Таким чином, андрогенізація жіночого організму до статевого дозрівання індукує запуск і розвиток початкових стадій оваріального фолікуло-

генезу. Швидкість зростання малих фолікулів більше прискорюється під впливом ДГТ, ніж тестостерону. На завершальних стадіях фолікулогенезу андрогени і, особливо, ДГТ стимулюють атрезію фолікулів, що пов'язано з недостатністю секреції ЛГ гіпофізом. Гальмування останнього спричиняє пригнічення оваріального фолікулогенезу на фінальних стадіях, що і пояснює затримку чи відсутність першої овуляції у ході пубертації самиць.

L.B. Litvinova

OVARIAN FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANDROGENIZED RATS IN PUBERTY

In experiment on rats injected with aromatase inhibitor or with dihydrotestosterone (DHT) it has been revealed that increase of androgens level in blood stimulates ovarian folliculogenesis on its early stages. DHT as compared with testosterone accelerates small follicles growth more effectively. Androgens, particularly DHT (7 mkg/100 g), suppress preovarial follicles maturing and turn them into atretic ones. Suppressing of ovarian functional activity delays or blockages the first ovulation during rats puberty.

Ukrainian Reseach Institute of Endocrine Diseases Pharmacotherapy

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабичев В.Н.* Нейроэндокринный контроль процессов пубертации у человека и приматов // Пробл. эндокринологии. — 1994. — **40**, №4 — С. 51-56.
2. *Боярский К.Ю.* Овариальная стимуляция и фолликулогенез в конце 90-х годов: на пороге будущего // Пробл. репродукции. — 1997. — **3**, №4 — С. 61-68.
3. *Вундер П.А.* Значение изменения чувствительности гипоталамо-гипофизарной системы к тормозному влиянию полового гормона на регуляции тонической секреции гонадотропинов и функции размножения // Успехи соврем. биологии. — 1990. — **110**, №1 (4) — С. 143-159.
4. *Дегтярь В.Г.* Роль 5 α -восстановленных 3,17-диолов у млекопитающихся // Там же. — 1992. — **112**, №3 — С. 422-436.
5. *Дегтярь В.Г., Кушлинский Н.Е.* Метаболизм андрогенов // Там же. — 2000. — **120**, №1 — С. 48-59.
6. *Литвінова Л.Б.* Статеві стероїди в ініціації пубертатогенезу у самок // Фізіол. журн. — 2000. — **46**, № 3. — С. 33-37.
7. *Мищенко А.Г., Тронько Н.Д.* Молекулярные механизмы действия андрогенов // Там же. — 1985. — **31**, № 6 — С. 717-729.
8. *Патология* полового развития девочек и девушек / Под ред. Ю.А. Крупко-Большовой, А.И. Корниловой. — К.: Здоровья, 1990. — 232 с.
9. *Савченко О.Н., Арутюнян Н.А., Степанов М.Г.* Экспериментальное бесплодие. Эндокринные аспекты. — СПб.: Наука, 1992. — 232 с.
10. *Сапоцкий И.В., Фоменко В.Н.* Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. — М.: Медицина, 1979. — 232 с.
11. *Сергиенко Л.Ю.* Биосинтез, метаболизм и физиологическая роль андрогенов в женском организме. В кн.: Эндокринные заболевания и синдромы. Вирилизм / Под ред. М.С. Бирюковой. М.: Знание, Запорожье: Знание, 1999. — С. 9-54.
12. *Хиршфилд А.Н., Шмидт В.А.* Кинетические аспекты развития фолликулов у крысы // Онтогенез. — 1989. — **20**, №1. — С. 5-27.
13. *Шилин Д.А.* Ретроспективная оценка течения пубертата при синдроме гиперандрогении // Пробл. эндокринологии. — 1996. — **42**, №1 — С. 20-25.

14. *Bogovich K., Richards J. S.* Androgen synthesis during follicular development. Evidence that rat granulosa cell 17-ketosteroid reductase is independent of hormonal regulation // *Biol. Reprod.* — 1984. — **1**. — P. 122-131.
15. *Chang S. C. S., Ryan R.J., Kang J. H.* Some observations on the development and function of ovarian follicles. — In.: *Control of reproduction in the cow.* The Hague. Martinus Nijhoff. — 1978. — P. 3-33.
16. *Cohen J., Dorf Ch., Rabair B.* Plasma concentration of free 5 α — androstano 3 α , 17 β -diol and related gonadal steroids during spontaneous and induced sexual maturation in the female rat // *Biol. Reprod.* — 1984. — **30**. — P. 105-111.
17. *Conway B. A., Manesh V.B., Mills T.M.* Effect of dihydrotestosterone on the growth and function of ovarian follicles in intact immature female rats primed with PMSG // *J. Reprod. and Fert.* — 1990. — **90**, N1. — P.267-277.
18. *Devoto L., Vega M., Castro O.* Effect of the aromatase inhibitor 4-hydroxyandrostene-3, 17-dione progesterone synthesis by human luteal cells // *Fert. and Steril.* — 1991. — **55**, N5. — P. 922-926.
19. *Dhanasekaran N., Moudgal N. R.* Studies of follicular androgen: Role of tropic hormone and steroid in regulation of cathepsin — D activity of preantral follicles of the immature rat // *J. Mol. and Cell. Endocrinol.* — 1986. — **44**, N1. — P. 77-84.
20. *Goorop A. J., Giribling-Hegge L.* The androgen and estrogen concentrations in the rat ovary // *J. Endocrinol.* — 1982. — **93**. — P. 25-30.
21. *Hiller S.* Paracrine regulation of follicular E₂ synthesis // *Sem. Reprod. Endocrinol.* — 1991. — **9**. — P. 332-440.
22. *Leveque N. W., Grotjan H. E. Jr.* Testosterone inhibition of LRH — induced luteinizing hormone release by cultures of rat anterior pituitary cells: effect of inhibitors of steroid 5 α — reductase // *Acta endocrinol.* — 1982. — **100**, N2. — P. 196-205.
23. *Ludwig D. J.* The effect of androgen on spermatogenesis // *Endocrinology.* — 1950. — **46**, N5. — P. 453-481.
24. *Martin B. T., Betteridge A., Craven R. P.* Regulation of gonadotrophin biosynthesis in the rat anterior pituitary by gonadoliberin and androgens // *Biochem. Soc. Trans.* — 1988. — **16**, N2. — P. 170-171.
25. *Moore G. P.M., Lintern-Moore S., Peters H.* RNA synthesis in the oocyte // *Cell Biol.* — 1974. — **60**. — P. 416-422.
26. *Ojeda S. R., Urbanski H. F.* Puberty in rat. In: E. Kobil, J. D. Neill (eds.). *The physiology of reproduction.* 2-nd edit.. New York: Raven Press, Ltd., 1994. — P. 364-409.
27. *Uilenbroek J. J., van der Linder R.* Changes in gonadotropin binding to rat ovaries during sexual maturation // *Acta Endocrinol.* — 1983. — **103**. — P. 413-419.

Укр. наук. досл. ін-т фармакології
ендокрин. захворювань, Харків

Матеріал надійшов
до редакції 9.10.2000