© А.Л.Бочкарева, С.В.Мичурина, В.И.Коненков, И.Г.Бочкарев, 2015
УДК 611.651:599.323.4

А.Л.Бочкарева, С.В.Мичурина, В.И.Коненков, И.Г.Бочкарев

ИЗМЕНЕНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОГО АППАРАТА И СОСУДОВ ЯИЧНИКОВ У КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕЛАТОНИНА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ

Группа гистолимфатических отношений, лаборатория функциональной морфологии лимфатической системы (руков. — проф. С.В.Мичурина), Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, г.Новосибирск

Исследование проведено на 155 самках крыс линии Вистар (возраст 3 мес, масса 180–200 г), находившихся в фазе диэструса полового цикла. Изучено влияние гормона шишковидной железы мелатонина (МТ) на морфологическую организацию фолликулярного аппарата и сосудистого русла яичников крыс после перегревания до достижения ректальной температуры 43,5 °С. Установлено, что гипертермическое воздействие приводит к увеличению относительной площади артерий, вен и лимфатических сосудов яичников. Перегревание вызывает нарушение фолликулогенеза. Введение МТ после воздействия гипертермии приводит к более быстрому (уже на 7-е сутки после воздействий) восстановлению венозного кровообращения и лимфатического дренажа яичников, что подтверждается нормализацией относительных размеров артерий, вен и лимфатических сосудов яичников до таковых в контроле. Это, в свою очередь, способствует уменьшению морфологических проявлений нарушений фолликулогенеза и создает условия для ускоренного восстановления относительной площади генеративных элементов яичников (на стадиях первичных, предовуляторных и атретических фолликулов) уже с 7-х суток после гипертермии.

Ключевые слова: *яичники, фолликулы, кровеносные и лимфатические сосуды, гипертермия, мелатонин*

Известно, что различные экстремальные воздействия приводят к нарушениям систем адаптации и детоксикации, а также десинхронизации биоритмов организма. В восстановлении нарушенного гомеостаза и оптимизации функций различных органов и систем принимает участие гормон шишковидной железы мелатонин (МТ). МТ также участвует в регуляции секреции половых гормонов, обеспечивая, тем самым, созревание и функционирование репродуктивной системы [1, 2, 4, 5].

В современных условиях возрастает негативное влияние на организм человека высоких температур окружающей среды. Установлено, что перегревание вызывает глубокие нарушения деятельности организма, в частности, органов репродуктивной системы [7–9, 14]. Влияние МТ на структурную организацию яичников в условиях гипертермии изучено недостаточно.

Цель настоящего исследования — оценка морфологических изменений фолликулярного аппарата и сосудов яичников у крыс под влиянием МТ в разные сроки после воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ).

Материал и методы. В эксперименте использовали 155 крыс-самок линии Вистар (возраст 3 мес, масса 180–200 г). Животных содержали при температуре воздуха 20–22 °С на стандартном пищевом рационе при свободном доступе к воде. Экспериментальные воздействия выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Животных, находящихся в фазе диэструса полового цикла, подвергали ЭГ в соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [6]. Температурный режим нагрева горячей воды-теплоносителя подбирался экспериментально и составил 45 °С. Время разогревания каждой особи до ректальной температуры 43,5 °С было индивидуальным, не зависело от исходной температуры тела, массы животного и составляло не более 17 мин. Уровень ЭГ, при котором прекращали разогревание, определялся ректальной температурой 43,5 °С (стадия теплового удара). Гибели крыс от гипертермии не было. В качестве исходного брали препарат МТ ICN Biomedical Inc. (США). МТ вводили в день проведения ЭГ и в последующие 2 сут после захода солнца (по 0,1 мг МТ в 0,2 мл физиологического раствора-«Плацебо»). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом на 3-, 7-е и 14-е сутки после однократного воздействия ЭГ. Выделено 7 групп животных: 1-я — контрольная (интактные животные) — n=23, 2-я группа — на 3-и сутки после ЭГ (ЭГ+3 сут), 3-я — на 7-е сутки после ЭГ (ЭГ+7 сут), 4-я — на 14-е сутки

Сведения об авторах:

Бочкарева Алла Львовна (e-mail: bochkarevaalla@bk.ru), *Мичурина Светлана Викторовна* (e-mail: s.michurina@ ngs.ru), *Коненков Владимир Иосифович, Бочкарев Игорь Гельевич*, группа гистолимфатических отношений, лаборатория функциональной морфологии лимфатической системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Относительная площадь структурных элементов яичника крысы ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$, %)

Структурные элементы яичника	Контроль — интактные животные	3-и сутки		7-е сутки		14-е сутки	
		Гипертермия	Гипертермия + мелатонин	Гипертермия	Гипертермия + мелатонин	Гипертермия	Гипертермия + мелатонин
Артерии	0,73±0,11	0,73±0,13	0,79±0,14	0,39±0,08*	0,67±0,11#	0,48± 0,09*	0,84±0,15#
Вены	2,66±0,20	6,8±0,6*	3,47±0,26*, #	2,4±0,3	2,69±0,27	1,01±0,17*	2,7±0,3#
Лимфатические сосуды	1,37±0,13	6,2±0,6*	2,16±0,25*, #	2,9±0,4*	1,15±0,17#	1,74±0,14	0,84±0,15*, #
Фолликулы:							
примордиальные	0,36±0,03	0,140±0,020*	0,15±0,03*	0,140±0,020*	0,180±0,020*	0,18±0,03*	0,140±0,020*
первичные	0,51±0,04	0,220±0,010*	0,220±0,020*	0,030±0,0020*	0,170±0,010*, #	0,280±0,020*	0,24±0,03*
вторичные	3,18±0,21	6,6±0,4*	6,3±0,4*	5,0±0,3*	5,5±0,5*	5,7±0,5*	6,0±0,5*
предовуляторные	6,5±0,6	6,6±0,3	7,7±0,5*, #	2,61±0,22*	10,8±1,0*, #	8,6±0,6*	4,3±0,5*, #
атретические	0,60±0,05	1,96±0,16*	2,41±0,18*, #	15,0±1,3*	5,8±0,6*, #	11,1±1,1*	10,9±0,9*

* Различия значимы по сравнению с контролем при P<0,05.

\# Различия значимы по сравнению с показателями в группе без введения мелатонина при P<0,05.

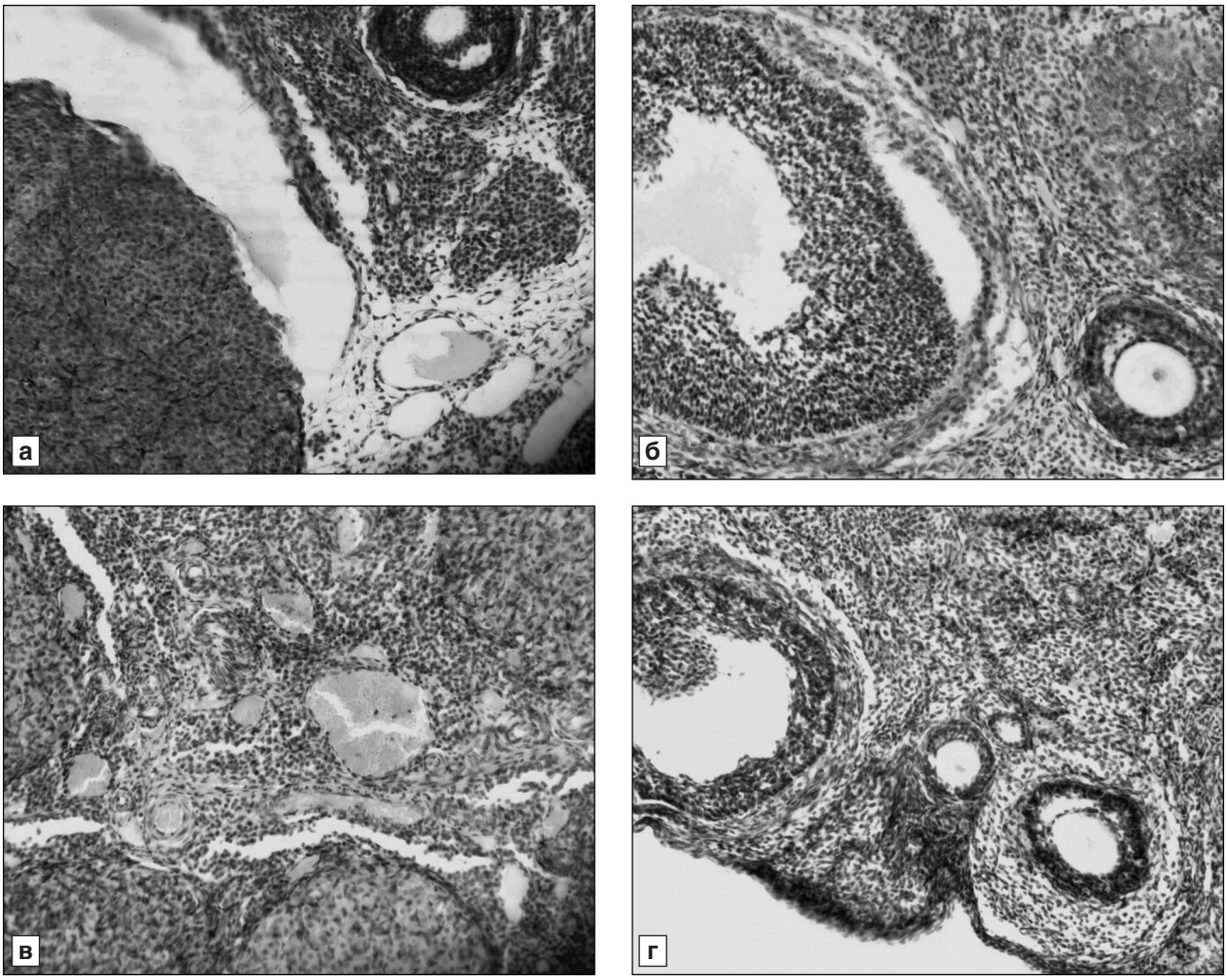
после ЭГ (ЭГ+14 сут), 5-я — на 3-и сутки после ЭГ и введения МТ (ЭГ+МТ+3 сут), 6-я — на 7-е сутки после ЭГ и введения МТ (ЭГ+МТ+7 сут), 7-я — на 14-е сутки после ЭГ и введения МТ (ЭГ+МТ+14 сут). Животным 2-, 3-й и 4-й групп после ЭГ вводили подкожно по 0,2 мл физиологического раствора. В каждую экспериментальную группу входили по 22 животных. Яичники брали после декапитации животных под эфирным наркозом. Для светооптического исследования яичники фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в парафин, готовили серийные срезы толщиной 5–6 мкм и после депарафинизирования окрашивали их гематоксилином Майера — эозином. Методом точечного счета вычисляли относительную суммарную площадь сосудов коркового и мозгового вещества яичников, а также примордиальных, первичных, вторичных, предовуляторных и атретических фолликулов.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007 на PC Pentium 4 в среде Windows с использованием статистического пакета «Statistica 5.5», с вычислением средних величин и их стандартных ошибок. Различия между показателями в контрольной и подопытных группах оценивали по критерию Стьюдента и считали значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. Введение МТ животным в условиях перегревания приводит к развитию в яичниках морфологических изменений меньшей тяжести, чем в группе животных без коррекции.

На 3-и сутки после ЭГ в яичниках животных (группа ЭГ+3 сут) и по сравнению с интактными наблюдается резко выраженный венозный застой, отечность интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции, расширение лимфатических сосудов. Хотя в яичниках животных, получавших МТ (группа ЭГ+МТ+3 сут), наблюдаются признаки венозного застоя, отечности интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции, однако эти изменения менее выражены, чем в группе крыс без введения МТ (группа ЭГ+3 сут). Это подтвердили и данные морфометрического анализа, показавшие, что относительная площадь вен в группе ЭГ+3 сут в 2,5 раза, а лимфатических сосудов — в 4,6 раза превышает контрольные значения. В яичниках животных, получавших МТ (группа ЭГ+МТ+3 сут), выявлено существенное уменьшение значений аналогичных показателей по сравнению с таковыми в группе без введения МТ и меньшее их возрастание, чем в контрольной группе (относительная площадь вен увеличивается в 1,3 раза, а лимфатических сосудов — в 1,6 раза) (*таблица*). Полученные данные свидетельствуют об улучшении кровообращения и лимфатического дренажа в органе при введении МТ уже в острый период после воздействия.

Оценка относительной площади фолликулярного аппарата яичников показала, что в острый период после воздействия ЭГ (3-и сутки) эффекта



Яичник крысы на 7-е (а, б) и 14-е сутки (в, г) после воздействия высокой температуры (а, в) и после воздействия высокой температуры и введения мелатонина (б, г).

Окраска гематоксилином Майера — эозином. Ув. 250

введения МТ практически не наблюдается (см. таблицу).

На 7-е сутки после ЭГ в группе без введения МТ — ЭГ+7 сут восстановления морфологической организации сосудистых компартментов яичников не происходит (*рисунок, а*); количественный анализ показал, что относительная площадь артерий в 2 раза ниже, чем в контроле, а относительная площадь лимфатических сосудов в 2 раза превышает контрольные значения.

В группе животных, получавших МТ, на 7-е сутки после воздействия происходит полное восстановление кровообращения и лимфотока в яичниках, сопровождающееся уменьшением отечности тканей яичника (см. рисунок, б). Это подтверждают и данные морфометрического анализа, показавшие изменение относительной площади артерий, вен и лимфатических сосудов яичников в этой группе до уровня контроля (см. таблицу), что создает условия для быстрого восстановления генеративных элементов органа.

Количественная оценка фолликулярного аппарата яичников выявила, что на 7-е сутки после воздействия относительная площадь первичных фолликулов в группе без коррекции (ЭГ+7 сут) снижается в 17 раз по сравнению с контролем. В то же время, в группе с введением МТ (ЭГ+МТ+7 сут) происходит менее выраженное снижение этого показателя в 3 раза по сравнению с контролем. Относительная площадь предовуляторных фолликулов в группе ЭГ+7 сут снижается до 40% от исходного уровня, в то время как относительная площадь предовуляторных фолликулов в группе ЭГ+МТ+7 сут в 1,6 раза выше, чем в контроле — у интактных животных. Отчетливо выраженный эффект наблюдается также и в отношении атретических фолликулов, относительная площадь которых в группе ЭГ+МТ+7 сут в 10 раз превышает контрольные значения, в

то время как в группе ЭГ+7 сут — в 25 раз (см. таблицу). Относительная площадь примордиальных фолликулов в группе ЭГ+7 сут снижена в 2,5 раза по сравнению с контролем и сохраняется на том же уровне и в группе с коррекцией МТ (см. таблицу).

На 14-е сутки после ЭГ в яичниках местами сохраняется расширение интерстициальных несосудистых путей микроциркуляции и лимфатических сосудов, наблюдается гемостаз (см. рисунок, в). В группе с введением МТ (ЭГ+МТ+14 сут) морфологическая организация сосудистых компартментов яичников соответствует норме (см. рисунок, г). При количественной оценке фолликулярного аппарата яичников на 14-е сутки после воздействия ЭГ выявлено, что относительная площадь предовуляторных фолликулов на треть превышает контрольный уровень. В группе ЭГ+МТ+14 сут относительная площадь этих фолликулов незначительно снижена по сравнению с контролем (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. В настоящее время установлено, что тепловой стресс (включая воздействия высокой температуры как климатического фактора) приводит к развитию бесплодия посредством различных механизмов, в том числе, изменяя гормональную секрецию, он участвует в повреждении яйцеклеток [7, 13]. При воздействии повышенной температуры (41 °С) в фолликулярных клетках яичников у коров выявлено снижение продукции эстрадиола и увеличение секреции прогестерона, что приводит к их преждевременной дифференциации и лютеинизации [9]. Большинство исследователей считают главным механизмом гибели клеток при воздействии температуры выше 40 °С денатурацию белка, которая вызывает изменения структуры молекул цитоскелета и мембран клеток, повреждение ферментов, участвующих в синтезе и репарации ДНК, что индуцирует в яичниках процессы программируемой клеточной гибели фолликулярных клеток и овоцитов [7, 13, 14].

Наиболее многочисленные исследования посвящены применению гипертермии в онкологической практике. Доказано, что воздействие ЭГ повышает чувствительность злокачественных клеток к лучевой и химиотерапии [8]. Основными механизмами этого процесса считаются дезинтеграция клеточных мембран и развитие сосудистых повреждений в опухоли, включая ингибицию кровотока. Также одним из механизмов негативных эффектов воздействия высокой температуры на морфологическую организацию яичников являются нарушения кровообращения [14] и, согласно данным нашего исследования, лимфотока в органе, приводящие к расширению интерстициальных пространств и появлению отека и, как следствие, формированию лимфостаза в зоне лимфосбора в яичниках. Такие морфологические перестройки способствуют развитию тканевой гипоксии и нарушению гуморальной регуляции, которые приводят к значительным изменениям фолликулогенеза, вызывают усиление процессов дегенерации и атрезии фолликулов [13]. В нашем исследовании это проявлялось снижением относительной площади примордиальных, первичных и предовуляторных фолликулов, а также увеличением относительной площади атретических фолликулов. При этом наиболее значительные изменения наблюдались на 7-е сутки и сохранялись до 14-х суток после перегревания. Следует подчеркнуть, что обеспечение и поддержание гомеостаза развивающихся фолликулов прямо зависят от интенсивности микроциркуляции, поскольку при движении крови, интерстициальной жидкости и лимфы происходят перенос различных веществ и обмен информацией между структурными элементами яичника, а нарушение кровообращения и лимфотока способствует развитию гипоксии, нарушению проницаемости митохондриальных мембран и гибели клеток [3]. Известно, что экстремальное перегревание (до 42–43 °С) запускает в организме механизмы развития окислительного стресса с активацией процессов перекисного окисления липидов на фоне инактивации антиоксидантной защиты. При окислительно-восстановительном дисбалансе в клетках яичников развиваются патологические изменения, которые способствуют активации апоптоза клеток [8].

В настоящее время общепризнано, что МТ является основным синхронизатором биологических ритмов организма, универсальным эндогенным адаптогеном и иммуномодулятором [2, 5]. МТ расценивается как гормональный мессенджер, модулирующий активность репродуктивной и других систем в зависимости от фотопериодического окружения [4]. Наше исследование показало, что введение МТ приводит к менее выраженным нарушениям морфологической организации яичников в острый период после ЭГ и способствует развитию восстановительных изменений в яичниках на 7-е и 14-е сутки по сравнению с таковыми у животных, не получавших инъекций гормона.

В группе животных с введением МТ выявлена более быстрая (уже на 7-е сутки после ЭГ) нормализация нарушений венозного русла и лимфатического дренажа яичников до уровня в контроле. Полученные нами данные согласуются с работами других исследователей, установивших регулирующее влияние МТ на сосудистый тонус

за счет связывания с собственными рецепторами у гладких миоцитов и эндотелиоцитов кровеносных сосудов [5]. Известно, что первым звеном механизма регионарного клеточно-тканевого дренажа является перемещение тканевой воды в интерстициальных тканевых пространствах к корням лимфатической системы, завершающееся лимфообразованием [3].

Восстановление интерстициальной несосудистой микроциркуляции при введении МТ (на 7-е и 14-е сутки после перегревания) свидетельствует о разгрузке регионарного аппарата дренирования яичника, что способствует улучшению процессов лимфодетоксикации в органе [3]. При этом, введение МТ, нормализуя кровообращение и лимфоток в яичниках, создает условия для более быстрого восстановления генеративных элементов (первичных и предовуляторных фолликулов) уже на 7-е сутки после ЭГ, а также приводит к уменьшению процессов атрезии фолликулов.

Можно предположить, что одним из механизмов этого процесса является участие МТ в регуляции программируемой клеточной гибели, поскольку рецепторы МТ (МТ1 и МТ2) были обнаружены в клетках яичника на плазмолемме, ядерных мембранах и в цитоплазме [11, 15]. Под контролирующим влиянием МТ также находятся процессы пролиферации клеток яичников и продукции ими гормонов. Показано, что экзогенный МТ стимулирует секрецию прогестерона и эстрадиола и приводит к подавлению апоптоза клеток, но не пролиферации [15].

Необходимо отметить, что нейрогормон МТ обладает способностью непосредственно нейтрализовывать свободные радикалы и родственные токсические вещества и их вредное воздействие на клетки и ткани, поэтому его введением обеспечивается дополнительная антиоксидантная защита организма [4] и репродуктивной функции женщин [5, 10]. Также установлено, что МТ предохраняет макромолекулы (белки, жиры, ядерную и митохондриальную ДНК) от оксидативного повреждения во всех субклеточных структурах [4, 10]. Антиоксидантная способность МТ обеспечивается его способностью детоксицировать свободные радикалы за счет образования «антиоксидантно-мелатонинового каскада». Выявлены регулирующее влияние МТ на процессы программируемой клеточной гибели и состояние Ca^{2+}-каналов клеток, приводящее к ингибиции апоптоза клеток в условиях окислительного стресса [12, 15].

Таким образом, установлено корригирующее влияние МТ на морфологическую организацию кровеносных и лимфатических сосудов, фолликулярного аппарата яичников (уже на 7-е сутки после перегревания). Результаты исследования указывают на возможность использования МТ с целью коррекции нарушений генеративной функции, вызванных воздействием высокой температуры, а также могут являться основой для разработки патогенетической лимфотропной терапии заболеваний органов репродуктивной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Виноградова И.А. Старение женской репродуктивной системы и мелатонин. СПб.: Система, 2008.
2. Арушанян Э.Б. Гормон эпифиза мелатонин и его лечебные возможности // Русск. мед. журн. 2005. Т. 13, № 26. С. 1755–1760.
3. Бородин Ю.И. Внутренняя среда организма и корни лимфатической системы. Проблемы лимфангиологии. Новосибирск: Манускрипт, 2010.
4. Кветная Т.В., Князькин И.В., Кветной И.М. Мелатонин-нейроиммуноэндокринный маркер возрастной патологии. СПб.: ДЕАН, 2005.
5. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновский Н.К., Анисимов В.Н. Мелатонин в норме и патологии. М.: ИД Медпрактика, 2004.
6. Патент РФ № 2165105. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / А.В.Ефремов, Ю.В.Пахомова, Е.А.Пахомов, Р.Ш.Ибрагимов, Г.Н.Шорина. Заявка от 22.12.1999 г. Опубл. в БИ. 2001. № 10. С. 308–309.
7. Aroyo A., Yavin S., Arav A., Roth Z. Maternal hyperthermia disrupts developmental competence of follicle-enclosed oocytes: in vivo and ex vivo studies in mice // Theriogenology. 2007. Vol. 67, № 5. P. 1013–1021.
8. Bagewadikar R.S., Patil M.S. Effect of mild whole body hyperthermia on cytotoxic action of N-metyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Swiss mice // Toxicol. Lett. 2001. Vol. 121, № 1. P. 63–68.
9. Bridges P.J., Brusie M.A., Fortune J.E. Elevated temperature (heat stress) invitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles // Domest Anim. Endocrinol. 2005. Vol. 29, № 3. P. 508–522.
10. Cruz M.H., Leal C.L., Cruz J.F. et al. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage // Theriogenology. 2014. Vol. 82, № 7. P. 925–932.
11. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance // Biomed. Pharmacother. 2006. Vol. 60, № 3. P. 97–108.
12. Tanabe M., Tamura H., Taketani T. et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice // J. Reprod. Dev. 2015. Vol. 61, № 1. P. 35–41.
13. Tseng J.K., Chen C.H., Chou P.C. et al. Influences of follicular size on parthenogenetic activation and in vitro heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes // Reprod. Domest. Anim. 2004. Vol. 39, № 3. P. 146–153.
14. Uchida S., Hotta H., Hanada T. et al. Effects of thermal stimulation, applied to the hindpaw via a hot water bath, upon ovarian blood flow in anesthetized nonpregnant rats // J. Physiol. Sci. 2007. Vol. 57, № 4. P. 227–233.

15. Wang S.J., Liu W.J., Wu C.J. et al. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2) // Theriogenology. 2012. Vol. 78, № 7. P. 1517–1526.

Поступила в редакцию 25.02.2014
Получена после доработки 30.04.2015

CHANGES IN THE FOLLICULAR APPARATUS AND BLOOD VESSELS OF THE OVARIES IN RATS INDUCED BY MELATONIN UNDER CONDITIONS OF HYPERTHERMIA

A.L.Bochkaryova, S.V.Michurina, V.I.Konenkov, I.G.Bochkaryov

The study was conducted on 155 female Wistar rats (aged 3 months, body mass — 180–200 g), in diestrus phase of the sexual cycle. The effect of the pineal hormone melatonin (MT) on morphological organization of the follicular apparatus and the vasculature of the ovaries was studied in rats after overheating achieving a rectal temperature of 43.5 ºC. It was found that hyperthermic exposure lead to an increase of the relative areas of the arteries, veins and lymph vessels of the ovaries. Overheating caused disturbances of folliculogenesis. The injection of MT after exposure to hyperthermia resulted in a quick (already on Day 7 after exposure) recovery of the disturbances of the venous circulation and lymphatic drainage of the ovary, as evidenced by the normalization of the relative sizes of arteries, veins and lymphatic vessels of the ovary, reaching control values. This, in turn, contributed to the reduction of morphological disorders of folliculogenesis and created the conditions for accelerated recovery of the relative area of generative elements of the ovary (at the stages of primary, preovulatory and atretic follicles) as early as 7 days after hyperthermia.

Key words: *ovaries, follicles, blood and lymph vessels, hyperthermia, melatonin*

Group of Histolymphatic Relations, Laboratory of Functional Morphology of Lymphatic System, RAS Siberian Branch Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk