

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ ПРИ ПРЕРЫВИСТЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ\*

Кузьмина И. Ю., Жуликова М. В.

*Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина  
irina.u.kuzmina@gmail.com;  
mvzhulikova@gmail.com*

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) остается одной из актуальных проблем гинекологической эндокринологии. СПКЯ представляет собой хронический симптомокомплекс на основе эндокринных нарушений, характеризующийся формированием фолликулярных кист в обоих яичниках [1].

Актуальность данной проблемы заключается в том, что изучение метаболических нарушений с использованием современных эндокринологических и молекулярно-биологических исследований не только позволит прояснить патогенетические механизмы СПКЯ, а также поможет обосновать и предложить методы восстановления репродуктивного здоровья у пациенток с СПКЯ [2].

СПКЯ — гетерогенная патология, характеризующаяся ожирением, хронической ановуляцией, гиперандрогенией, нарушением гонадотропной функции, увеличением размеров яичников и особенностями их морфологической структуры [3].

Одним из клинико-диагностических критериев СПКЯ является ожирение. Ожирение встречается у 35–60 % больных с СПКЯ, и они чаще, чем худые пациентки, страдают ановуляцией и гирсутизмом [4].

Длительное время лечение СПКЯ было направлено на восстановление менструальной и генеративной функций. Как показывают клинические наблюдения, терапия СПКЯ только экзогенными гормонами без учета метаболических нарушений и по-

\* Работа выполнена в соответствии с плановой НИР кафедры патологической физиологии им. Д. Е. Альперна Харьковского национального медицинского университета «Роль медіаторних механізмів в патогенезі хронізації запалення та обґрунтування принципів її профілактики» (№ госрегистрации 0118U000952).

Данная работа выполняется диссертантом кафедры патологической физиологии Жуликовой М. В. по теме диссертации «Патогенетичне обґрунтування застосування переривчастого холодowego впливу у попередженні розвитку синдрому полікістозних яєчників в експерименті» и финансируется за счет собственных средств.

Учреждением, финансирующим исследование, является Министерство Здравоохранения Украины.

Авторы гарантируют ответственность за объективность представленной информации.

Авторы гарантируют отсутствие конфликта интересов и собственной финансовой заинтересованности.

Рукопись поступила в редакцию 18.09.2018.

казателей регуляторов жирового обмена и уровней адипоцитокинов в периферической крови, не всегда приводит к желаемым результатам [5].

СПКЯ часто способствует развитию инсулинорезистентности и, как следствие, гиперинсулинемии, играющих важную роль в избыточном образовании андрогенов [6]. Однако, гиперандрогенемия при СПКЯ в наибольшей степени обусловлена андрогенами яичникового происхождения. Андрогены, с одной стороны, являются облигатным субстратом для синтеза эстрадиола, обеспечивающего рост фолликулов, с другой — избыток андрогенов препятствует нормальному развитию фолликулов, нарушает процесс роста доминантного фолликула и вызывает атрезию. Таким образом, синтез андрогенов должен сохраняться на минимально необходимом для яичников уровне [7].

Исследования последних лет доказали, что жировая ткань обладает ауто-, пара- и эндокринной функцией, секретируя большое количество веществ, обладающих различными биологическими эффектами [8].

Имеются данные, что под воздействием прерывистых холодовых воздействий (ПХВ) в бурой жировой ткани (БЖТ) животных происходят адаптивные реакции, направленные на мобилизацию липидных запасов для генерации тепла [9]. Возможно, активация БЖТ путем прерывистого холодового воздействия приводит к повышению уровня адипоцитокинов, которые опосредованно могут влиять на секрецию гормонов репродукции и препятствовать развитию кистозных изменений в яичниках [10].

Адипонектин и лептин являются важными адипоцитокинами, которые тесно связаны с энергетическим обменом в ткани яичников [11].

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на половозрелых самках крыс популяции Вистар ( $n = 32$ ) 4–5 месячного возраста, массой тела 180–200 г.

Поликистозный процесс в яичниках моделировали путем ежедневного (в течение 25 суток) подкожного введения дегидро-

В настоящее время установлена прямая связь между уровнем адипонектина и СПКЯ что свидетельствует о важной роли процессов, которые участвуют в патогенезе развития данного заболевания [12]. В эксперименте показано, что адипонектин снижает инсулинорезистентность, стимулируя фосфорилирование тирозина, тем самым повышая действие инсулина в скелетных мышцах и печеночной ткани [13]. Известно, что уровень адипонектина в крови возрастает в условиях холодовых воздействий или акклиматизации [14].

Особое место в патогенезе метаболических нарушений занимает лептин, который секретируется клетками висцеральной жировой ткани, а основным органом-мишенью лептина является центральная нервная система [15]. Лептин снижает аппетит, стимулирует использование липидов в энергетическом обмене и уменьшает запасы жира в жировых депо. Общее количество лептина прямо пропорционально массе жировой ткани, физиологически выше у женщин, чем у мужчин. Исследования лептина у пациенток с СПКЯ немногочисленны и представляют клинический интерес, так как ожирение часто сопутствует СПКЯ [16]. Рецепторы к лептину выявляются в различных органах и тканях, в том числе в надпочечниках и яичниках. Спектр влияний этого гормона изучен пока недостаточно, а имеющиеся данные об его эффектах при СПКЯ разрозненны, хотя в последние годы получены данные об участии лептина в регуляции репродуктивной функции [17].

Целью данного исследования явилось изучение влияния прерывистых холодовых воздействий у самок крыс при экспериментальном СПКЯ для уточнения патогенеза и профилактики его развития.

эпиандростерона ацетата (ДГЭА, «Sigma»), растворенного в 0,2 мл очищенного и стерилизованного оливкового масла. Доза ДГЭА составляла 60 мг/кг массы тела крысы [18].

ПХВ осуществляли путем ежедневного выдерживания животных в течение 4 часов в камере (с 10-00 до 14-00), при температу-

ре +4 °С (согласно методике Galton W. A., Nisula B. C., 1998). Оставшиеся 20 часов крысы находились в стандартных условиях содержания для данного вида животных.

Перед и после охлаждения температуру кожи измеряли по шкале Цельсия, с помощью цифрового инфракрасного термометра (Microlife IR 1DE1, Швейцария) на спине животного.

Измерение температуры тела производили в ротовой полости крысы при помощи тарированной медь-константановой термопары и электронного вольтметра В7-21 с последующим пересчетом полученных значений в мкВ в градусы.

Исследование проводилось в соответствии с национальным руководством «Общие этические принципы исследований на животных» (Украина, 2012), которое согласовано с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), а также Хельсинской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1964–2000), уставом Украинской ассоциации по биоэтике и нормам GLP (1992).

Животные были разделены на 4 группы, по 8 крыс в каждой:

- 1 группа — животные, которые подвергались ПХВ;
- 2 группа — животные, которых после экспериментально вызванного поликистоза яичников при помощи ДГЭА подвергали ПХВ;
- 3 группа — животные, которым вызывали экспериментальный СПКЯ введением ДГЭА и, которые содержались в виварии при температуре + 23 °С;
- 4 группа — интактный контроль.

На 26 сутки животных забивали, извлекали матку и яичники. Органы взвешивали, после чего фиксировали в 4 % параформальдегиде (ПФА, «Sigma») в течение 4 часов, после чего переносили на 12 часов в 25 % раствор сахарозы на фосфатно-солевом буфере. Относительную массу органов рассчитывали как отношение веса матки и яичников к весу тела животного, умноженное на 100 %. 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), затем окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Микрофотосъемку производили с помощью светооптического микроскопа с цифровой камерой Amscope IN300T (Китай). Морфометрический анализ фотографий серийных срезов 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. Показатели нормировали на 1 срез ткани. Морфометрический анализ ткани матки включал измерение высоты эпителия, количество желез на единицу площади, толщину стенки матки. Данные массы яичников и матки представлены в процентах от массы тела.

Уровни лептина и адипонектина в плазме крови животных определяли иммуноферментным методом (ИФА), с использованием набора реактивов «Leptin ELISA» и «Adiponectin ELISA» (Kit Diagnostics, США). Определение уровня адипоцитокinov проводили по стандартному протоколу, основанного на принципе «сэндвич».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Excel» и «Stactica 10», методом параметрической и непараметрической статистики, в соответствии с рекомендациями по обработке результатов медико-биологических исследований (Гланц М., 1999; Реброва О. Ю., 2006). Проверяли соответствие распределения дат в выборках закону нормального распределения, с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Использовали однофакторный дисперсионный анализ для сравнения выборок, с достоверностью различий  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выдерживание животных в течение 4 часов при 4°C приводило к снижению температуры тела (Тт) у животных 1 и 2 группы, особенно на 3–6 сутки ПХВ (рис. 1). В целом изменение Тт у крыс представляет собой начальное снижение Тт с последующим, постепенным его повышением и достижением нормального уровня (на 20 сутки) при завершении адаптации. Подобное снижение Тт описано в других исследованиях и является адекватной реакцией организма на холодовое воздействие подобного рода [19].

Отсутствие достоверных различий в динамике восстановления Тт у крыс 1 и 2 групп может свидетельствовать о сохранении нормальной терморегуляторной функции организма крыс, получавших ДГЭА.

На рисунке 2 представлены данные относительной 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 достоверно различались между группами.

Относительная масса матки значимо увеличивалась в группах с введением ДГЭА (группы 2 и 3) по сравнению с интактным контролем.

Такую же тенденцию к увеличению массы матки у крыс с экспериментальной моделью СПКЯ наблюдали Zhang Y. и соавт. [20].

Одним из характерных признаков СПКЯ является гиперплазия текальных клеток яичников. При измерении толщины слоя текальных клеток в яичниках крыс было установлено, что данный показатель имеет тенденцию к возрастанию в группах с ПХВ (группы 1 и 2) и достоверно увеличивается в 3-й группе (введение ДГЭА) по сравнению с интактным контролем (рис. 3). Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что экзогенное введение андрогенов в организм экспериментальных животных приводит к гиперплазии текальных клеток как характерного признака СПКЯ.

Нами отмечено некоторое расширение слоя текальных клеток в 1-й группе (без введения ДГЭА, но с ПХВ). Полученные дан-

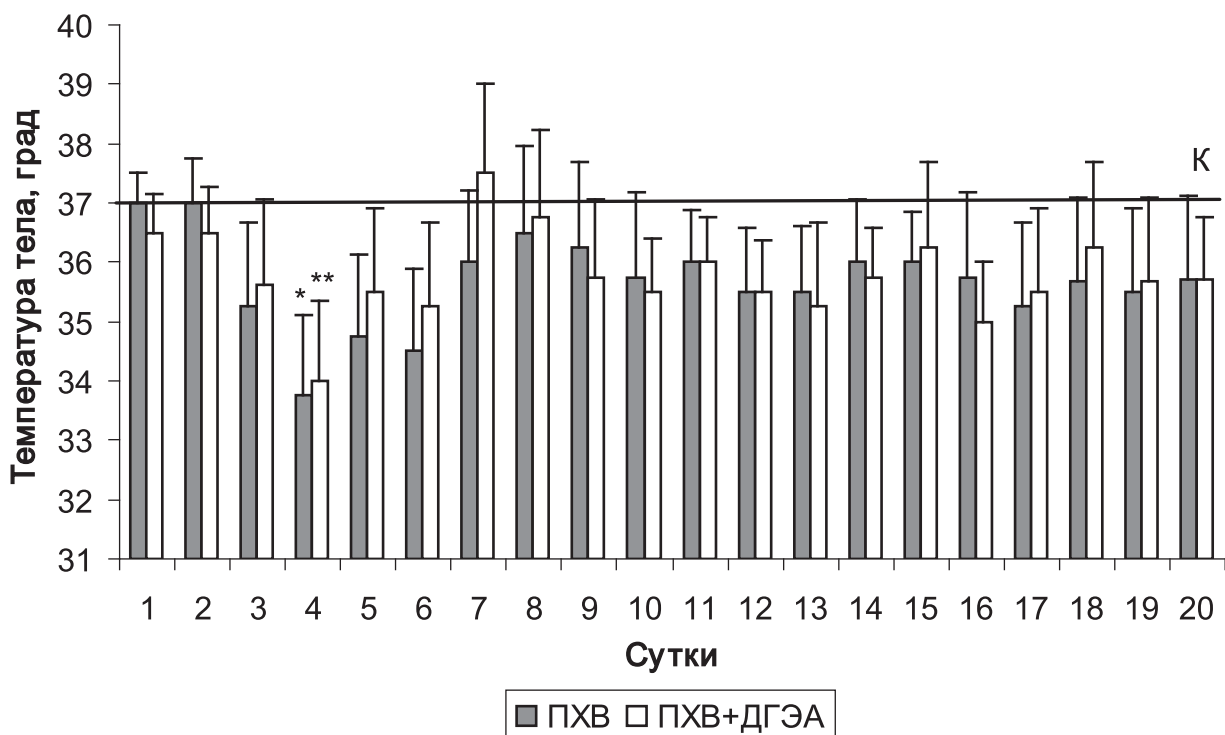


Рис. 1. Динамика изменения температуры тела крыс (по Цельсию), после ПХВ (1 и 2 группы),  $p < 0,05$ .

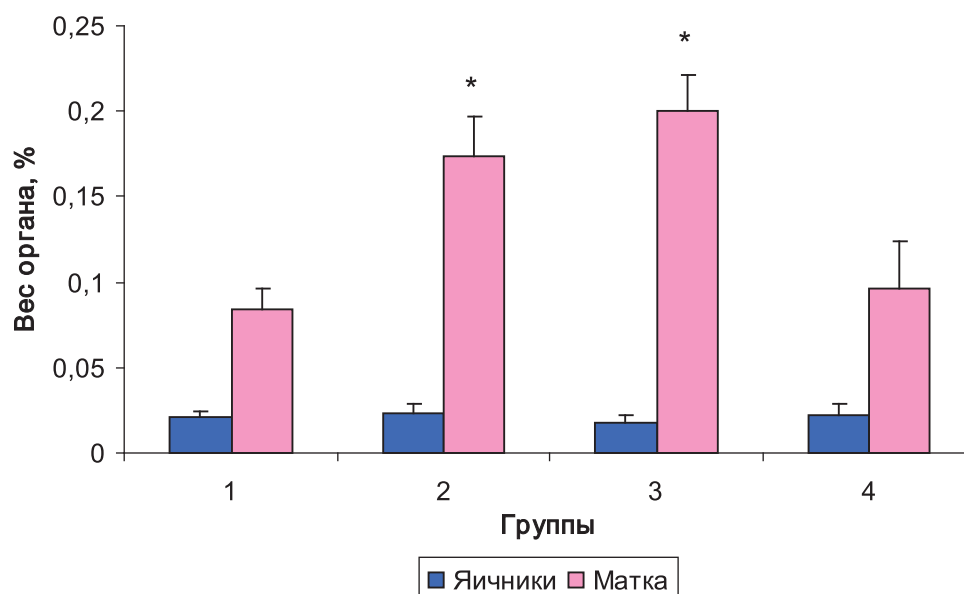


Рис. 2. Относительная масса яичников и матки крыс разных экспериментальных групп.  
\* — достоверное отличие показателя при сравнении с данными интактного контроля,  $p < 0,05$ .

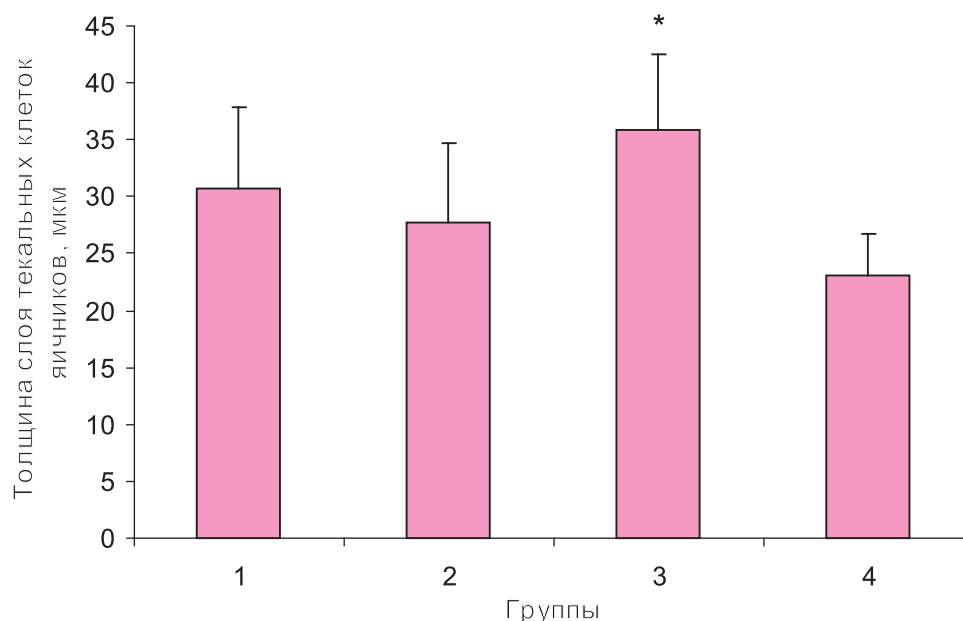


Рис. 3. Толщина слоя текальных клеток яичников крыс разных экспериментальных групп.  
\* — достоверное отличие показателя при сравнении с данными интактного контроля,  $p < 0,05$ .

ные позволяют предположить, что в условиях холодого стресса происходит активация секреции эндогенных андрогенов надпочечниками, что и приводит к незначительной гиперплазии текальных клеток яичников.

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 ( $0,1 \pm 0,08$  в 3 группе при сравнении с  $0,3 \pm 0,02$  в группе интактного контроля,  $p < 0,05$ ). 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, мы не обнаружили в яичниках кисты, а количество желтых тел не отличалось от показателей группы интактного контроля.

Количественные морфометрические показатели яичников крыс экспериментальных и интактной группы представлены в таблице 1.

Установлено, что в группах с введением ДГЭА (группы 2 и 3) наблюдалось увеличение количества преантральных и антральных фолликулов, 3-я группа (СПКЯ без ПХВ) также характеризовалась повышенным количеством атретических фолликулов.

В результате проведенных экспериментов доказано, что после ПХВ активизируются внутриклеточные приспособительно-компенсаторные реакции в ткани яичников, проявляющиеся образованием нуклеолемных и ретикулярных ядрышек, увеличением площади поверхности ядра за счет образования многочисленных молодых митохондрий с упорядоченными кристами, которые восстанавливают структуру тка-

ни яичников, что возможно способствует предупреждению развития СПКЯ.

Кроме того, у крыс 1 и 2 групп, после ПХВ было выявлено значительное повышение уровня циркулирующего адипонектина и снижение концентрации лептина, по сравнению с животными 3 группы (табл. 2).

Из представленной таблицы видно, что ПХВ нормализует уровень адипонектина и снижает уровень лептина в крови крыс с экспериментальным СПКЯ до соответствующих показателей интактных животных.

В связи с вышеизложенным, можно сделать вывод, что ПХВ приводит к изменению уровней адипоцитокинов, которые косвенно могут влиять на секрецию гормонов репродукции и препятствовать развитию кистозных изменений в яичниках. Стимуляция адаптивных физиологических

Таблица 1  
Количество структурных элементов яичников крыс разных групп (нормированы на 1 срез), ( $\bar{X} \pm S_x$ ), n = 8

Группы	Типы фолликулов					Желтое тело	Киста
	Примордиальный	Первичный	Преантральный+ Антральный	Зрелый	Атретический		
ПХВ	3,9 ± 0,5	2,0 ± 0,1	3,3 ± 0,3	0,40 ± 0,02	2,5 ± 0,1	0,20 ± 0,09	–
СПКЯ + ПХВ	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,3	5,7 ± 0,4*	0,10 ± 0,01	2,2 ± 0,3	0,20 ± 0,1	–
СПКЯ	4,2 ± 0,6	2,5 ± 0,2	4,1 ± 0,2*	–	3,1 ± 0,1*	0,10 ± 0,08*	0,7 ± 0,3*
Интактный контроль	3,8 ± 0,4	1,9 ± 0,3	3,2 ± 0,4	0,20 ± 0,04	2,1 ± 0,2	0,30 ± 0,02	–

Примечание:

\* Статистически значимые отличия при сравнении с данными для группы «Интактный контроль»,  $p \leq 0,05$ .

Таблица 2  
Показатели уровней адипонектина и лептина в группах наблюдаемых животных, ( $\bar{X} \pm S_x$ ), n = 8

Показатели	Группы			
	ПХВ	СПКЯ + ПХВ	СПКЯ	Интактный контроль
Адипонектин, мкг/мл	24,5 ± 4,1	22,7 ± 4,3	12,5 ± 4,1*	20,8 ± 3,6
Лептин, нг/мл	5,2 ± 0,6	4,9 ± 0,8	15,9 ± 1,8*	4,4 ± 1,1

Примечание:

\* Статистически значимые отличия при сравнении с данными для группы «Интактный контроль»,  $p \leq 0,05$ .

реакций на фоне ПХВ возможно блокирует развитие признаков СПКЯ у крыс при экс-

периментальном поликистозе яичников, вызванным введением ДГЭА.

## ВЫВОД

Применение прерывистых холодовых воздействий при ежедневном содержании крыс в течение 4-х часов в камере, с постоянным световым режимом и температурой +4 °С приводит к нормализации структурных элементов яичниковой ткани, восстановлению толщины слоя текальных клеток яич-

ников и изменению концентрации в плазме крови адипоцитокинов (адипонектина и лептина) до уровня здоровых животных, что является важным патогенетическим механизмом профилактики развития синдрома поликистозных яичников.

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Alieva JeA. *Akusherstvo i ginekologija* 2004; 4: 3-7.
2. Vihljaeva EM. *Rukovodstvo po jendokrinnoj ginekologii, Moskva*, 2009: 360-395.
3. Gevorkjan MA, Manuhin IB, Kushlinskij NE, Kuharkina OB. *Problemy Reprodukcii* 2007; 6: 38-42.
4. Mazurov VI, Vorohobina NV, Baranovskij AJu, Volkova EA. *Bjulleten' S-Pb asociacii vrachej-terapevtov* 2005; 2 (2): 3-17.
5. Grigorjan OP, Anciferov MB. *Problemy Reprodukcii* 2003; 3: 21-27.
6. Gevorkjan MA, Kushlinskij NE, Manuhin IB. *Problemy Reprodukcii* 2004; 6: 21-23.
7. Rosenfield RL, Ehrmann DA. *Endocr Rev* 2016; 37 (5): 467-520.
8. Lee MT, Anderson ES, Lee GY. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113 (10): 2708-2713. doi: 10.1073/pnas.1523236113.
9. Cameron IL, Smith RE. *J Cell Biol* 1964; 23: 89-100.
10. Kuz'mina IJu, Zhulikova MV. *Ukr zhurn medycyny, biologii' ta sportu* 2018; 3 (3): 25-29.
11. Groth SW. *Biol Res Nurs* 2010; 12 (1): 62-72.
12. Deng Y, Scherer PE. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212: E1-E19.
13. Mirabolghasemi G, Kamyab Z. *Int J Fertil Steril* 2017; 11 (1): 47-55.
14. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, et al. *J Clin Invest* 2013; 123 (8): 3395-3403.
15. Fanchenko ND, Shhedrina R.N. *Nejrogumoral'naja reguljacija i sostojanie reproduktivnoj sistemy v period ee aktivnogo funkcionirovanija, Moskva*, 2008: 150-175.
16. Manuhin IB, Gevorkjan MA. *Problemy Reprodukcii* 2001; 6: 13-18.
17. Azziz R. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91 (3): 781-785.
18. Patent №119800. Sposib modeljuvannja syndromu polikistoznyh jajehnykiv.
19. Kozyreva TV, Yakimenko MA. *Fiziol Zh SSSR* 1979; 65: 1598-1602
20. Zhang Y, Hu M, Meng F, et al. *EBioMedicine* 2017; 18: 157-170. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.023.

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ  
РАЗВИТИЯ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ  
ПРИ ПЕРЕРЫВИСТЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Кузьмина И. Ю., Жуликова М. В.**

*Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина  
irina.u.kuzmina@gmail.com; mvzhulikova@gmail.com*

Целью исследования явилось изучение влияния прерывистых холодовых воздействий (ПХВ) на экспериментально вызванный синдром поликистозных яичников (СПКЯ) у самок крыс для уточнения патогенеза поликистоза яичников и предупреждения его развития. Моделирование СПКЯ проводилось путем подкожного введения крысам дегидроэпиандростерона ацетата (ДГЭА) в течение 25 суток. ПХВ моделировали методом ежедневного выдерживания животных в течение 4 часов в камере при температуре +4 °С.

В результате проведенных экспериментов доказано, что после ПХВ активизируются внутриклеточные приспособительно-компенсаторные реакции в яичниковой ткани, что способствует предупреждению развития СПКЯ. Помимо этого, ПХВ приводит к повышению уровня адипоцитокينات (адипонектина и лептина), которые косвенно могут влиять на секрецию гормонов репродукции и препятствовать развитию кистозных изменений в яичниках. Стимуляция адаптивных физиологических реакций на фоне ПХВ блокирует развитие признаков СПКЯ у крыс.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников, профилактика, холодовое воздействие, адипоцитокины.

**ПАТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ПРОФІЛАКТИКИ  
РОЗВИТКУ СИНДРОМУ ПОЛІКІСТОЗНИХ ЯЄЧНИКІВ  
ПРИ ПЕРЕРИВЧАСТИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВАХ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

**Кузьміна І. Ю., Жулікова М. В.**

*Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна  
irina.u.kuzmina@gmail.com; mvzhulikova@gmail.com*

Метою дослідження було вивчити дію переривчастих холодових впливів (ПХВ) на експериментально викликаний синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) у самок щурів для уточнення патогенезу полікістозу яєчників та попередження його розвитку. Моделювання СПКЯ проводилося шляхом підшкірного уведення щурам дегідроепіандростерона ацетату (ДГЕА) протягом 25 діб. ПХВ здійснювали шляхом щоденного витримування тварин протягом 4 годин на камері, в якій підтримувалась температура +4 °С.

В результаті проведених експериментів доведено, що після ПХВ активізуються внутрішньоклітинні пристосувально-компенсаторні реакції в тканині яєчників, що сприяє попередженню розвитку СПКЯ. Крім цього, ПХВ призводить до підвищення рівня адипоцитокінів (адипонектину і лептину), які опосередковано можуть впливати на секрецію гормонів репродукції та перешкоджати розвитку кістозних змін в яєчниках. Стимуляція адаптивних фізіологічних реакцій на тлі ПХВ ймовірно блокує розвиток ознак СПКЯ у щурів.

Ключові слова: синдром полікістозних яєчників, профілактика, холодовий вплив, адипоцитокіни.

**PATHOGENETIC ASPECTS OF THE INTERMITTENT  
OF THE DEVELOPMENT OF THE POLYCYSTIC OVARY SYNDROME  
WITH PROLONGED COLD INFLUENCES IN THE EXPERIMENT**

**I. U. Kuzmina, M. V. Zhulikova**

*Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine  
irina.u.kuzmina@gmail.com; mvzhulikova@gmail.com*

The aim of the research was to study the effect of intermittent cold effects (ICE) on the experimentally induced polycystic ovary syndrome (PCOS) in female rats to prevent the development of polycystic ovaries and elaboration the pathogenesis of its development. Simulation of PCOS was performed by subcutaneous injection of dehydroepiandrosterone acetate (DHEA) in rats for 25 days. A ICE was carried out by daily keeping the animals for 4 hours in a chamber in which the light regime and a temperature of +4 °C were maintained. As a result of the experiments, it has been proved that after intracellular adaptive-compensatory reactions are activated in the ovarian tissue, which helps prevent the development of PCOS. In addition, ICE leads to an increase in the level of adipocytokines (adiponectin and leptin), which can indirectly affect the secretion of reproduction hormones and inhibit the development of cystic changes in the ovary. Stimulation of adaptive physiological reactions against the background of ICE blocks the development of signs of PCOS in rats.

Key words: polycystic ovary syndrome, prevention, cold exposure, adipocytokines.