

УДК 611-08+611.821+611.631:591.4+59.082

В.С. Пикалюк

д. мед. н.

Е.Ю. Бессалова

к. мед. н.

Л.Р. Шаймарданова

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского

**ГИПОФИЗАРНЫЙ МЕХАНИЗМ АТРЕЗИИ Фолликулов в Яичниках
СВИНЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БЕСПЛОДИИ, ВЫЗВАННОМ
ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ**

В работе описаны особенности морфологических проявлений бесплодия и атрезии овариальных фолликулов, вызванные парентеральным введением ксеногенной спинномозговой жидкости, проанализировано значение гонадотропной функции гипофиза в обеспечении роста фолликулов различного типа и нарушение фолликулогенеза при дисфункции гипоталамо-гипофизарной системы. В результате проведенных исследований обоснованы центральные механизмы воздействия СМЖ на периферические органы и намечены перспективы дальнейших исследований в данном направлении.

Актуальность темы

В современных условиях развития науки, в частности медицины и ветеринарии, регуляция репродукции, разработка и применение вспомогательных репродуктивных технологий, контроль фертильности имеют большое биологическое, демографическое и социальное значение. В настоящее время в литературе не прекращаются дискуссии относительно феномена атрезии фолликулов в яичниках млекопитающих животных и человека, роли атрезии в физиологии овариальной железы, селекции фолликулов, а также при патологических состояниях, сопровождающихся ановуляцией [1]. Не менее актуально изучение роли и механизмов апоптоза овоцитов и соматических клеток овариальных фолликулов в процессе атрезии [2]. Представителями крымской школы морфологов под руководством проф. В.В. Ткача на протяжении многих лет изучались биологические свойства спинномозговой жидкости (СМЖ) млекопитающих [3, 4]. При этом СМЖ рассматривалась как важнейшая биологическая жидкость, являющаяся гуморальной средой головного мозга, выполняющей важную регуляторную функцию за счет содержания огромного спектра биологически активных веществ. В наших исследованиях был выявлен интересный феномен: при парентеральном введении СМЖ лактирующих коров самкам свиней в различные периоды постнатального онтогенеза наблюдается активация атрезии фолликулов в яичниках, сопровождающаяся изменением показателей фертильности, при этом степень выраженности изменений и их обратимость зависят от возраста животных [4, 5, 6]. Большой интерес представляет исследование и обоснование данного явления, имеющего как практическое значение в регуляции фертильности млекопитающих, так и теоретическое

значение, поскольку это новые данные о биологических свойствах ликвора и механизмах его регуляторных воздействий.

Цель исследования – выявить морфофункциональные проявления атрезии фолликулов в яичниках свиной при экспериментальном бесплодии, вызванном парентеральным введением ксеногенной спинномозговой жидкости; обосновать роль гипофиза как интегрального звена эндокринной системы в возникновении выявленных изменений.

Задачи исследования: 1) описать особенности морфологических проявлений атрезии фолликулов, вызванной введением СМЖ; 2) проанализировать значение гонадотропной функции гипофиза в обеспечении нормального роста фолликулов различного типа, а также нарушения фолликулогенеза при дисфункции гипоталамо-гипофизарной системы; 3) обосновать центральные механизмы воздействия СМЖ на периферические органы; 4) наметить перспективы дальнейших исследований в данном направлении.

Объекты и методика исследования

В качестве животных-доноров ликвора использовали лактирующих коров после первого отела. Ликвор получали прижизненно методом субокципитальной пункции без применения анестезии и сохраняли в жидком азоте. Подопытные свиные разделены на следующие группы: новорожденные (14-е сутки жизни), неполовозрелые (60-е сутки жизни), ранней половозрелости (в возрасте 6 месяцев); в каждой группе по 20 самок. СМЖ свиным подопытной группы вводили однократно внутримышечно из расчета 2 мл на кг массы тела. Контрольную группу составили самки свиной того же возраста, которым внутримышечно вводили 0,9 % раствор NaCl в аналогичной дозе. Животных забивали поэтапно, чтобы проследить динамику морфологических изменений в яичниках вплоть до периода полового созревания и становления репродуктивной функции. Строение яичников изучали при помощи классических морфологических методик (макроскопических и гистологических), а также ряда оригинальных методов, адаптированных для изучения яичников крупных млекопитающих [7, 8]. Функцию яичников исследовали на основании изменения половых циклов и показателей фертильности. При анализе данных органометрии и гистометрии использованы статистические методы.

Объект исследования – показатели фертильности, структурные компоненты яичников свиной в норме и при введении ксеногенной СМЖ, механизмы эндокринной регуляции репродукции.

Результаты исследования

В результате проведенного исследования выяснилось, что СМЖ лактирующих коров вне своего естественного резервуара оказывает выраженное ингибирующее воздействие на показатели фертильности и детерминирует соответствующие морфологические изменения в яичниках свиной. Однократное введение ксеногенной СМЖ свиным в период

новорожденности и в возрасте 2 месяцев вызывает стойкое бесплодие и отсутствие циклических изменений репродуктивной системы, что связано с блокировкой фолликулогенеза на этапе селекции доминантных фолликулов, ановуляция при этом обусловлена атрезией всех полостных фолликулов. Снижается масса подопытных самок в сравнении с контрольными. Парентеральное введение ксеногенной спинномозговой жидкости вызывает в яичниках свиней значительные морфологические перестройки, связанные с регрессией паренхиматозных элементов, нарушением процессов фолликулогенеза, активацией стромальных компонентов. Степень выраженности и характер гистологических перестроек в яичниках зависят от возраста животных. Максимальные изменения структуры яичников выявлены при введении ксендиликвора в период новорожденности. Увеличивается масса, объем, коэффициент массы, относительная площадь стромы и сосудистого русла яичников в подопытной группе животных. В яичниках свиней подопытной группы наблюдается остановка роста большинства полостных фолликулов, достигших диаметра 4–5 мм, лишь 1/3–1/4 часть из них продолжает рост, но, не достигая размеров зрелых преовуляторных фолликулов, подвергается атрезии, превращаясь в крупные атретические тела. Утолщается белочная оболочка в яичниках подопытных свиней. Аналогичное введение ликвора после наступления полового созревания сопровождается обратимыми изменениями показателей фертильности и обратимыми морфологическими изменениями овариальной железы. При введении СМЖ в возрасте 6 месяцев происходит атрезия всех крупных фолликулов, сопровождающаяся формированием атретических тел и отсутствием овуляции, с последующим восстановлением репродуктивной функции.

Морфологические проявления активации атрезии. Строение вступивших в рост фолликулов в опыте отличается тем, что среди них встречается достаточно большое число фолликулов на различных стадиях атретического процесса. Выражена асимметрия организации растущих фолликулов, в опыте встречаются фолликулы разнообразных причудливых форм. При этом рост и дифференцировка клеток в фолликуле происходит как в едином функциональном комплексе, затрагивая эпителиальную и соединительнотканную его части. Среди полостных фолликулов подавляющее большинство атретических, II, III степени атрезии. Все они имеют неправильную форму, диаметр овоцита уменьшен, ядро пикнотичное, прозрачная зона утолщена, в некоторых атретических фолликулах обнаружены признаки деления созревания овоцита с последующей его гибелью (рис. 1). Зернистая оболочка разрыхляется, ядра фолликулоцитов подвергаются пикнозу, в зернистом слое наблюдаются участки, в которых фолликулоциты полностью отделены от базальной мембраны или базального слоя и находятся в полости фолликула. Фибриллярные компоненты базальной мембраны разрыхляются, переходя в волокна межклеточного вещества теки, вследствие этого теряются четкие контуры базального слоя фолликулярного эпителия, увеличивается толщина базальной мембраны. В соединительнотканной оболочке фолликулов выявляются отек, дезорганизация коллагеновых волокон. Вакуолизация цитоплазмы фолликулоцитов и признаки их гибели

сочетаются с разрастанием и лютеинизацией тека-клеток, замещающих полость погибшего фолликула с последующим образованием атретического тела. Зрелых неатретических фолликулов в яичниках свиной подопытной группы нет. Интерстициальные клетки в яичниках представлены всеми популяциями: интерстициоциты стромального типа, текациты в составе гипертрофированной внутренней теки, имеющей в фолликулах подопытных свиной большее количество слоев в сравнении с аналогичными фолликулами контроля, клетки многочисленных атретических тел. Часть интерстициоцитов входит в состав желтых тел, располагаясь на их периферии и по ходу микрососудов. Морфометрические показатели фолликулогенеза свидетельствуют о дегенеративных процессах в растущих фолликулах всех генераций, гибели овоцитов в них. Достоверное снижение площади фолликулов всех типов свидетельствует о задержке их роста и созревания либо о начале атрезии части фолликулов. Развитие зернистой оболочки является одним из определяющих показателей величины фолликула. Изменение толщины зернистой оболочки подчинено в опыте тем же закономерностям, что и площадь фолликула. Толщина внутренней и наружной текальной оболочек, напротив, в опыте достоверно больше (рис. 2), что может являться морфологической основой андрогенизации. Максимальные морфометрические отличия выявлены при сравнении площади овоцитов в контрольной и подопытных группах. Площадь овоцита в опыте в растущих фолликулах всех генераций достоверно ниже, чем в контроле, что является закономерным явлением при атрезии фолликула, сопровождающейся гибелью овоцита. Площадь ядра овоцита в подопытной группе также достоверно снижена в растущих фолликулах всех генераций. Толщина прозрачной зоны и блестящей оболочки в опыте больше.

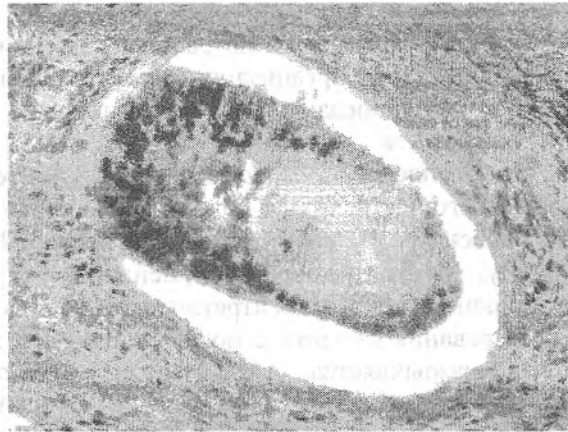


Рис. 1. Фрагмент яичника свиной 1-й подопытной группы в возрасте 14 месяцев. Атретический первичный фолликул в корковой зоне яичника. Слущивание фолликулярных клеток, выраженная деформация фолликула, утолщение блестящей оболочки, конденсация хроматина в ядре овоцита. Целлоидин. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

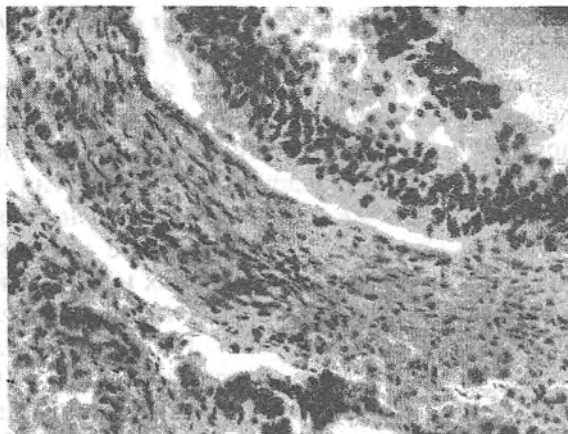


Рис. 2. Фрагмент коркового вещества яичника свиньи 2-й подопытной группы в возрасте 9 месяцев. Значительное утолщение текальной оболочки по всему периметру фолликула.

Слабое развитие сосудистого сплетения теки.

Разобщение фолликулярных клеток и сплывание их в полость фолликула. Окраска гематоксилином и эозином. Парафин. × 400

В яичниках свиней подопытных групп основную часть коркового вещества составляют атретические тела, представленные различными морфогенетическими вариантами (рис. 3) (облитерационный вариант с полной деструкцией гранулезы, атрезия с гипертрофией теки и сохранением зернистой оболочки, а также смешанные варианты).

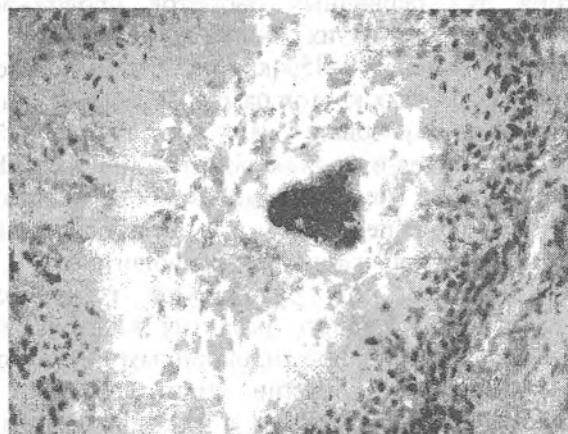


Рис. 3. Фрагмент коркового вещества яичника свиньи 3-й подопытной группы в возрасте 9 месяцев. Атретическое тело облитерационного типа.

Окраска гематоксилином и эозином. Целлоидин. × 400

Значение гонадотропной функции гипофиза в обеспечении нормального роста фолликулов различного типа, а также нарушения фолликулогенеза при дисфункции гипоталамо-гипофизарной системы. Рост фолликулов в яичниках млекопитающих далее стадии преантральных фолликулов в отсутствие или при дефиците гонадотропной стимуляции не происходит [1]. При патологии фолликулогенеза эндокринной этиологии атрезия является практически облигатной, особенно при поражении центральных механизмов эндокринной регуляции. При этом поступательное развитие фолликулов и овуляция становятся невозможными [1]. В наших исследованиях не выявлено активации дегенерационных форм атрезии мелких фолликулов, являющихся гонадотропиннезависимыми структурами. Напротив, механизм атрезии, преобладающий в яичниках подопытных свиней, носил характер продуктивного процесса, проявляясь множеством морфогенетических вариантов. Атрезия затрагивает преимущественно крупные фолликулы, рост которых зависит от гонадотропной гипофизарной стимуляции; во главе генеза их атретических превращений стоит дефицит фолликулостимулирующего гормона, а также нарушения выработки лютеинизирующего гормона и пролактина. Широко известна роль апоптоза в преобразованиях репродуктивной системы. В яичниках на протяжении жизни самок млекопитающих наблюдается высокая интенсивность апоптоза клеток без пополнения первоначального пула фолликулов. Так, максимальное количество половых клеток (около 7 млн) в яичниках человека наблюдается на 20-й неделе внутриутробного развития. В этот период большинство овогоний переходят от митотического деления к мейотическому делению (заканчивается размножение клеток, начинается их созревание). После этого две трети и более овоцитов гибнет путем апоптоза уже к периоду рождения.

После рождения пул первичных овоцитов продолжает таять, после достижения половой зрелости их остается не более 200–400 тысяч, окончательно созревает лишь 400–450 клеток. Таким образом, 99,994% всех образованных женских половых клеток разрушается путем апоптоза. Атрезию при этом можно характеризовать как контролируемый гормонами и цитокинами апоптоз овоцитов и фолликулоцитов яичников. Реверсия желтого тела, матки после родов и молочных желез после прекращения лактации, гибель неоплодотворенных яйцеклеток – все эти процессы происходят путем усиленного апоптоза клеток, являющегося физиологическим процессом [2]. В настоящее время известно, что существуют генетические механизмы регуляции мейоза и фолликулярного развития в целом, подчиненные как местным, так и центральным нейро-эндокринным регуляторным факторам. При этом ведущую роль в развитии апоптоза клеток фолликулярных гистионов играют внешние, центральные, а не интраовариальные факторы. В патоморфологии формирования атретического фолликула выражается проявление диалектического закона единства и борьбы противоположностей, так как в процессе неизбежной дегенерации овоцита наблюдается пролиферативный процесс и гипертрофия клеток теки и интерстиция. Основными слагаемыми развития нормального фолликула в процессе роста являются также пролиферация и клеточная дифференцировка, но преимущественно клеток зернистой оболочки. Очень важно то, что главным

митогеном, стимулюючим проліферацію гранулези і супресуючим апоптоз, являється гіпофізарний фолликулостимулюючий гормон. Таким образом, гіпофіз, по-видимому, являється вівідним звеном в генезі морфофункціональних змін яєчників при введенні СМЖ. Об зміні функції гіпофіза в наших експериментах свідчить зміна темпів росту і статевих зрілості, збільшення маси тіла піддослідних тварин, зумовлене його соматотропною функцією. В користь теорії переважно центрального впливу біологічно активного препарату СМЖ свідчить багато сучасних даних про тривалу персистенцію змін при впливі на організм різних факторів в ранній період онтогенезу [9]. В ранній період онтогенезу структурні компоненти ЦНС і ендокринної системи являються незрілими, слабо розвинутий гематоенцефалічний бар'єр, не завершено становлення регуляторних центрів гіпоталамо-гіпофізарно-епіфізарної системи, чим пояснюється так званий феномен програмування нейро-ендокринних структур [10, 11]. Але все ж не варто заперечувати значення периферических факторів в генезі атрезії. Чувствовість до гонадотропінів зумовлена ступенем розвитку механізмів рецепції гранулези, трофічним забезпеченням тканин яєчника [1, 12, 13]. Особливе значення має модулююче впливання гормонів периферических ендокринних заліз (щитовидної залізи, надпочечників), тиміческих пептидів, зміна функції яких також може бути викликане зміною секреції гіпофіза як центрального звена ендокринної системи.

Висновки

В результаті проведеного дослідження встановлено, що спинномозгова рідина лактуючих корів поза свого природного резервуару викликає виражене інгібуюче впливання на показники фертильності і детермінує відповідні морфологічні зміни в яєчниках свиней. Дані зміни зумовлені переважно центральними нейро-ендокринними факторами, найважливішим з яких є гіпофіз, як основне інтегративне звено ендокринної регуляції.

Перспективи дальнйших досліджень

Перспективно дальнйше дослідження будови і функції гіпофіза, а також інших ендокринних заліз і периферических внутрішніх органів при парентеральному введенні СМЖ. Це має як теоретичне (дослідження біологічних властивостей ліквору як найважливішої гуморальної середовища мозку, вивчення міжвидових взаємостосунків при використанні ксенопрепарату), так і прикладне значення (модуляція ендокринного статусу в ветеринарії, тваринництві, розробка лікарських препаратів, виділення фізіологічно активних метаболітів з СМЖ).

Література

1. Волкова О.В., Боровая Т.Г. Морфогенетические основы развития и функции яєчників. – М: Медицина, 1999. – 253 с.

2. Фільченков О.О., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: ТДМУ, 2006. – С. 103–111.
3. Ткач В.В., Королев В.А., Войналович С.А. Состояние органов репродуктивной системы свиней в условиях парентерального введения ксеногенной спинномозговой жидкости // Морфофункциональный статус млекопитающих и птиц: Мат. науч. конф. – Симферополь: Издательство КГМУ, 1995. – С. 217–218.
4. Бессалова Е.Ю., Ткач В.В., Королев В.А. Морфофизиологические эффекты ксеногенной спинномозговой жидкости на репродуктивную систему самок полиэстричных млекопитающих // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т. 9. № 3. – С. 175–178.
5. Бессалова Е.Ю., Ткач В.В., Ткач В.В. (младший). Парентеральное введение спинномозговой жидкости как причина активации атрезии фолликулов в яичниках полиэстричных млекопитающих животных. // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції “Актуальні проблеми сучасних наук: теорія і практика – 2006”. – Дніпропетровськ: Наука і освіта, 2006. – Т. 5. – С. 33–35.
6. Бессалова Е.Ю., Барсуков Н.П., Ивахненко В.Н. Изменения активности дегидрогеназ в тканях органов половой системы самок свиней при парентеральном введении ксеногенной спинномозговой жидкости (цитохимическое исследование) // Морфология. – 2006. – Т. 129. – № 1. – С. 80–84.
7. Бессалова Е.Ю. Физиологические и структурные методы оценки морфофункционального статуса яичников млекопитающих // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2006. – Т. 5. – № 3. – С. 85–90.
8. Бессалова Е.Ю. Оригинальная классификация фолликулов, адаптированная для экспериментального изучения яичников крупных млекопитающих // Тр. Крым. гос. мед. ун-та им. С.И. Георгиевского «Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения». Симферополь, 2006. – Т. 142, Ч. I. – С. 4–5.
9. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология / А.Г. Резников, В.П. Пишак, Н.Д. Носенко и др. – Черновцы: Медакадемія, 2004. – 351 с.
10. Влияние неонатальных воздействий на болевую и аудиогенную чувствительность и на содержание моноаминов в мозгу у взрослых крыс / В.В. Алексеев, В.Б. Кошелев, Г.И. Ковалев, И.И. Полетаева // Онтогенез. – 2003. – Т. 34. – № 6. – С. 464–471.
11. Вайсерман А.М. Влияние средовых факторов в раннем онтогенезе на старение и продолжительность жизни // Онтогенез. – 2004. – Т. 35, № 5. – С. 325–335.
12. Mihm M. Intrafollicular health markers during antral follicle wave development in cattle // Arch. Tierzuch. – 2001. – Vol. 44, Special Issue. – P. 24–29.
13. Talamantes F., Ortiz R. Structure and regulation on expression of the mouse GH receptor // J. Endocrinol. – 2002. – Vol. 175. – P. 55–59.