

ВЛИЯНИЕ KISS-ПЕПТИНА НА ЭСТРАЛЬНЫЙ ЦИКЛ КРЫС

Зарубина Е.Г.¹, Лысова А.Н.², Беляков В.И.¹

THE INFLUENCE OF KISS-PEPTIN ON ESTROUS CYCLE OF RATS

Zarubina E.G., Lysova A.N., Belakov V.I.

¹Кафедра медико-биологических дисциплин (зав. кафедрой – профессор Е.Г. Зарубина) НОУ ВПО МИ «Реавиз», Самара; ²кафедра акушерства и гинекологии (зав. кафедрой – профессор В.В. Горячев) НОУ ВПО МИ «Реавиз», Самара.

Проводилось экспериментальное изучение влияния фармакологической блокады кисспептинергических рецепторов на эстральный цикл крыс. Исследование выполнено на 36 половозрелых молодых самках крыс линии Wistar. Установлено, что кисспептин оказывает регулирующее влияние на эстральный цикл крыс, а блокада кисспептинергических рецепторов приводит к длительному нарушению эстрального цикла, заключающегося в исчезновении фазы овуляции и к развитию вторичного бесплодия.

Ключевые слова: кисспептин, блокатор кисспептинергических рецепторов, эстральный цикл, репродуктивная функция.

36 mature young female Wistar rats conducted an experimental study of the effect of pharmacological blockade kisspeptine receptors on rat's estrous cycle. Found that kisspeptin has a regulating effect on the estrous cycle of rats. The block of kisspeptine receptors leads to a prolonged disruption of the estrous cycle, consisting in the ovulation phase disappearance and the development of secondary infertility.

Keywords: kisspeptin, kisspeptin- receptor blocker, the estrous cycle, reproductive function.

Введение. Женское бесплодие - неспособность женщины к зачатию в детородном возрасте. Бесплодным принято считать брак, в котором при регулярной половой жизни и отсутствии контрацепции в течение 1 года не наступает беременность. Частота бесплодных браков составляет 15–17%, из них на долю женского бесплодия приходится до 40–60% от всех зарегистрированных случаев (<http://ilive.com.ua/>). Стабильно высокие показатели нарушений в репродуктивной сфере женщин связаны как с распространенностью воспалительных изменений в половой сфере

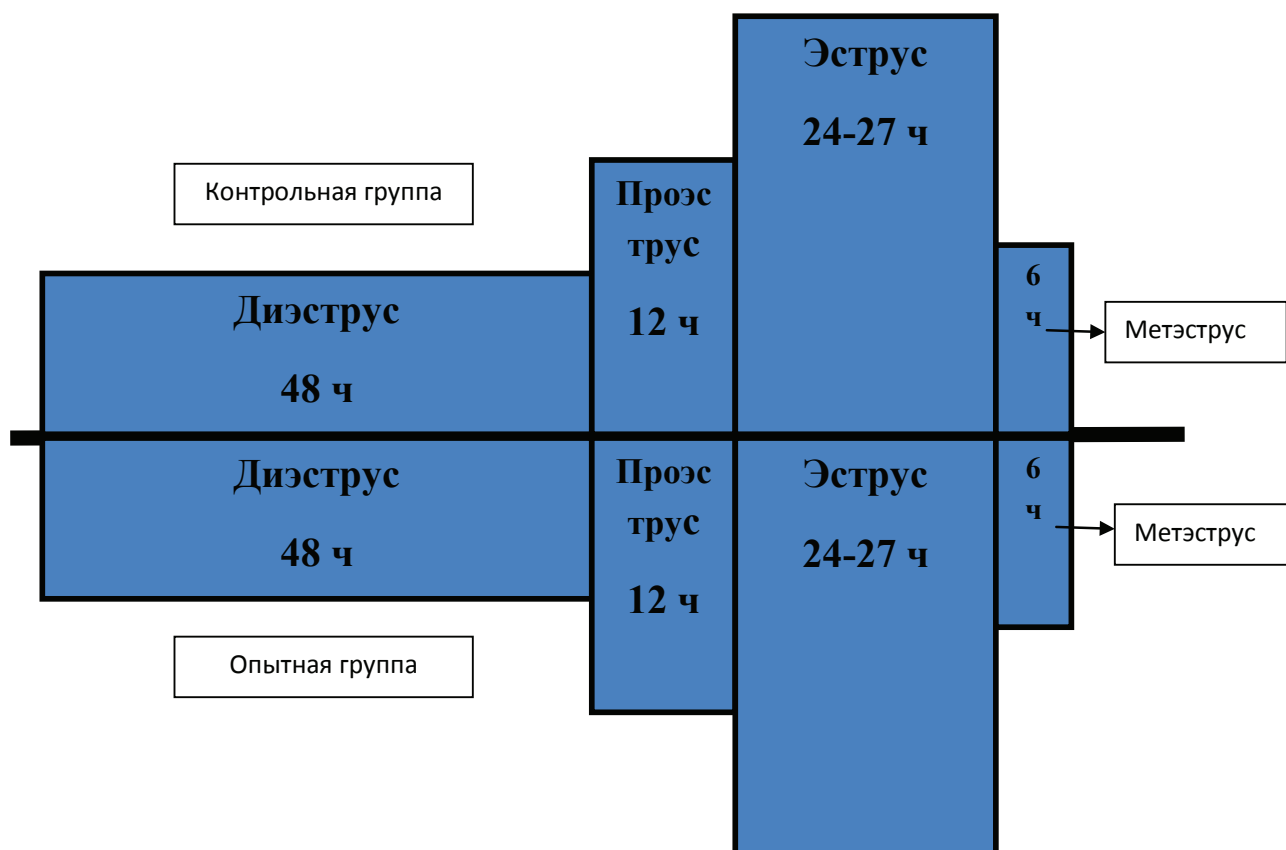
женщин, вовлечением их в целый ряд специальностей, обладающих негативным влиянием на женскую репродуктивную сферу, так и с ростом стрессогенных воздействий на фоне ускорения темпов урбанизации и ухудшения экологической обстановки в индустриально развитых странах. При этом сложность полового цикла женщины и его регуляторных механизмов, объясняет существующую недостаточную эффективность лечебных мероприятий в этой сфере. Кроме этого, до настоящего момента не изучены некоторые аспекты патогенеза формирования женского бесплодия [1]. Так в 1999 году был открыт гормон кисспептин («белок поцелуев»), кодируемый геном *kiSS-1*. Было установлено, что это, ранее неизвестное, вырабатываемое в организме естественным путем вещество, запускает процесс полового созревания в подростковом возрасте и в дальнейшем, возможно, отвечает за регуляцию репродуктивной функции организма [4]. Кисспептин увеличивает активность клеток гипоталамуса, выделяющих гормон гонадолиберин, который, в свою очередь, управляет уровнями лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), от которых зависит возникновение овуляции, а, следовательно, возможность зачатия [3]. Однако, до настоящего времени, достоверно не установлено, как влияют колебания его уровня на уже сформировавшуюся и нормально функционирующую репродуктивную сферу.

Цель исследования - экспериментальное изучение влияния фармакологической блокады GPR54 на эстральный цикл крыс.

Материал и методы исследования. Исследование выполнено на 36 половозрелых молодых самках крыс (возраст 5 месяцев) линии Wistar, весом $150,0 \pm 10,0$ г с учётом "Правил лабораторной практики в РФ и директив Европейской Конвенции по защите позвоночных животных" (Strasbourg, 1986). На первом этапе исследования изучалась ритмичность функционирования яичников животных. Оценка фаз эстрального цикла крыс проводилась на основе гистологического изучения влагалищных мазков (метод Стоккарда и Папаниколау, 1917). Методика основана на том, что каждой стадии полового цикла самок млеко-

Схема 1.

Соотношение фаз эстрального цикла у контрольной и опытной групп крыс линии Wistar до применения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA).



питающих соответствует определенная клеточная картина влагалищных выделений. [5]. Забор материала осуществлялся ежедневно на протяжении 4-х недель с помощью марлевого тампона. Мазки анализировались на микроскопе «Микмед» (2011) при увеличении 10х20, оснащенного цифровой насадкой для компьютерной визуализации изображения после окраски 0,5% спиртовым раствором метиленового синего. На втором этапе исследования все животные были разделены на 2 подгруппы по 18 (контроль) и 18 (опыт) особей с синхронизированными эстральными циклами. В первой подгруппе (контроль) каждой крысе в первый день диэструса в носовую ход вводился 0,9% раствор NaCl (10 мкл), а во второй подгруппе в эти же сроки такой же объем раствора (2х10⁻³ Моль) блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA). Далее на протяжении 10 дней ежедневно оценивались влагалищные мазки крыс обеих подгрупп для уточнения характера влияния кисспептина на эстральный цикл животных.

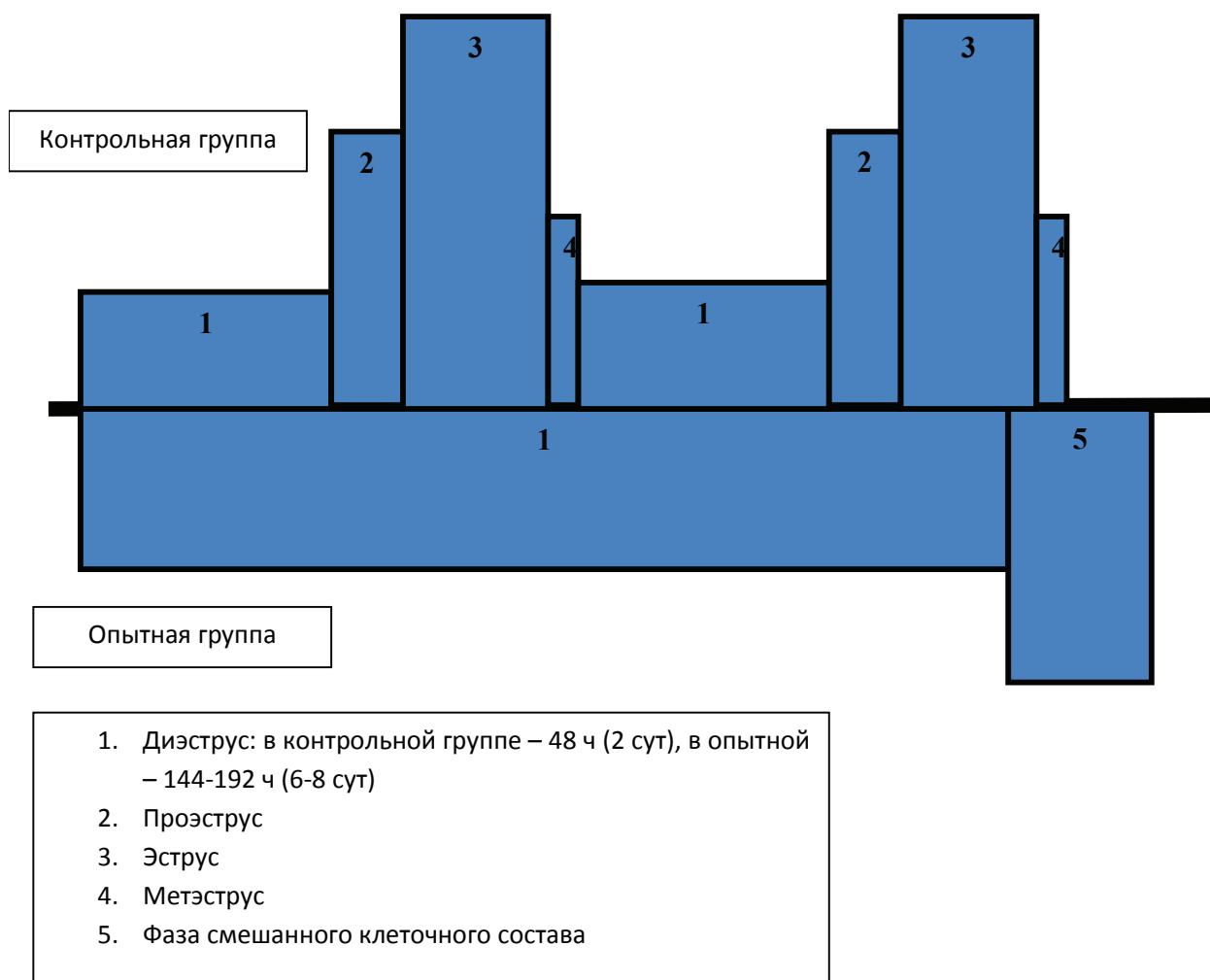
Результаты исследования и их обсуждение. Эстральный цикл у самок млекопитающих - это совокупность регулярно повторяющихся изменений половой системы, связанных с циклическим функционированием яичников, что определяет гормональную регуляцию синхронных изменений во всем организме самки, и, особенно, в ее половом аппарате (яйцеводы, матка и влагалище). Каждой фазе эстрального цикла в норме соответствуют определённые изменения слизистой оболочки влагалища и клеточного состава влагалищного содержимого [1].

В ходе первого этапа исследования было установлено, что у всех 36 животных, включенных в исследование, имелся регулярный эстральный цикл, включающий 4 фазы: диэструс (стадия покоя, или межтечки); проэструс (стадия подготовки к течке, или предтечки); эструс (течка); метэструс (стадия послетечки). Длительность эстрального цикла не превышала 5 суток.

Межтечка (диэструс) — покой вагинального эпителия, обусловленный низким уровнем

Схема 2.

Соотношение фаз эстрального цикла у контрольной и опытной групп крыс линии Wistar после применения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA).



эстрогенов в организме. В стадии диеструса, составляющей около 2-х суток эстрального цикла, в мазке у 100,0% животных преобладали слизь и лейкоциты (рис. 1).

В стадии проэструса, продолжающейся около 12 ч, мазок состоял почти из одних эпителиальных клеток, слущенных со стенок влагалища. Он совпадал с наиболее высоким уровнем секреции эстрогенов созревающими фолликулами яичника и характеризовался гипертрофией и гиперплазией эпителиальных клеток влагалища и последующим отторжением клеток, секретирующих слизь (рис. 2).

В стадии эструса (длительность около 24-27 ч) в мазке содержались преимущественно чешуйки — безъядерные, ороговевшие клетки, образующиеся из-за расслоения клеток эпителия (рис.3). Этот период в норме сочетается, обычно,

с активизацией полового поведения и по времени примерно совпадает с овуляцией.

В метэструс, длительность, которого, у животных обеих подгрупп не превышала 6 часов и регистрировалась не у всех животных, из-за периодичности осмотров в 24 часа, происходило резкое снижение активности половых гормонов с отторжением базального слоя клеток (рис.4).

Для подтверждения регулярности эстрального цикла у каждого животного было зафиксировано не менее 3-х последовательных циклов.

Таким образом, было установлено, что у всех животных как опытной, так и контрольной групп имелся нормальный регулярный эстральный цикл, совпадающий по продолжительности фаз. Его структура представлена на (схема 1).

На втором этапе исследования после введения в носовые ходы крыс блокатора кисс-

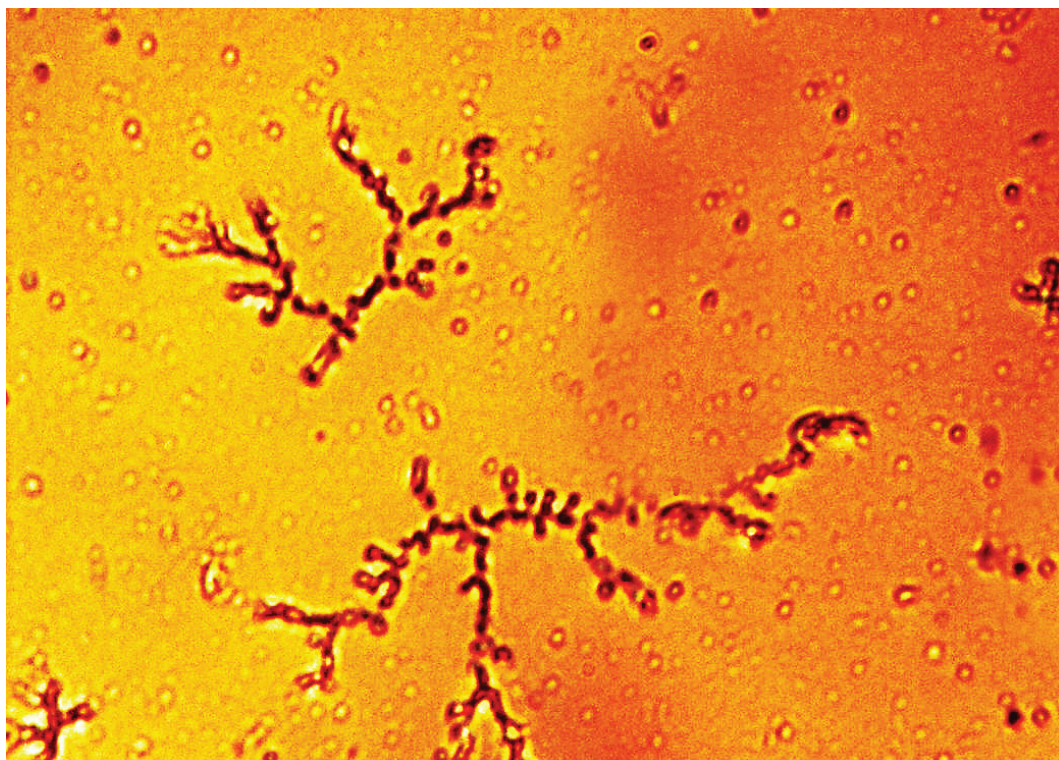


Рис. 1. Влагалищный мазок крысы. Стадия диэструса. Окраска метиленовым синим. Ув. 200.

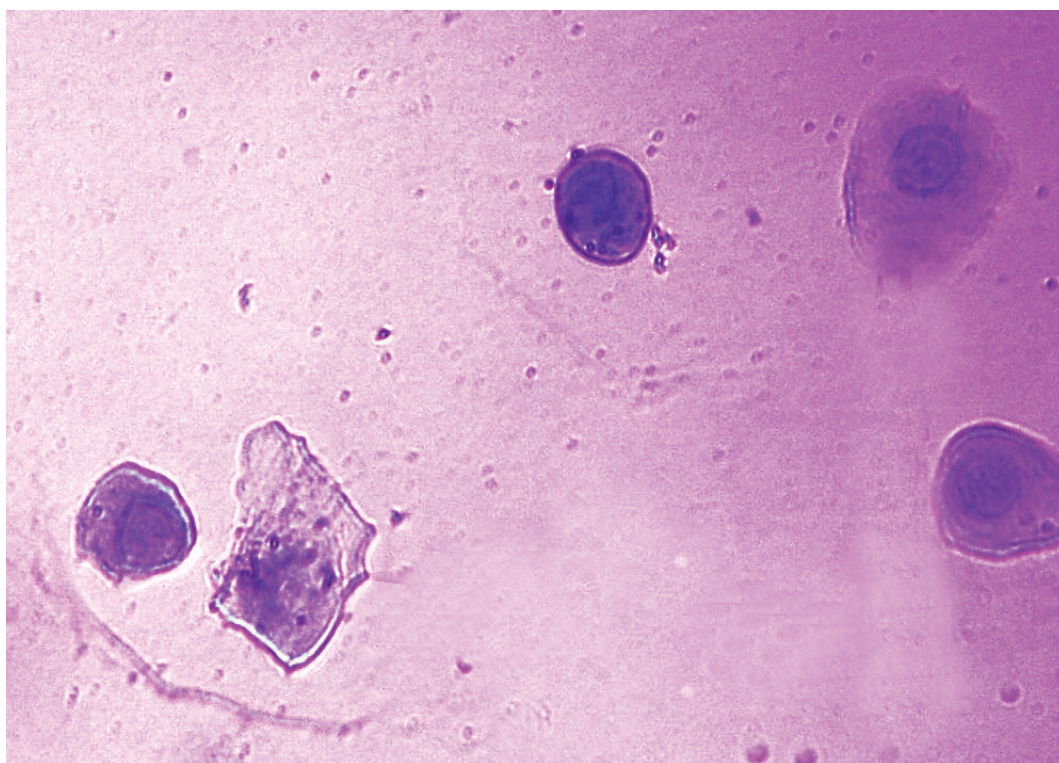


Рис. 2. Влагалищный мазок крысы. Стадия проэструса. Окраска метиленовым синим. Ув. 200.

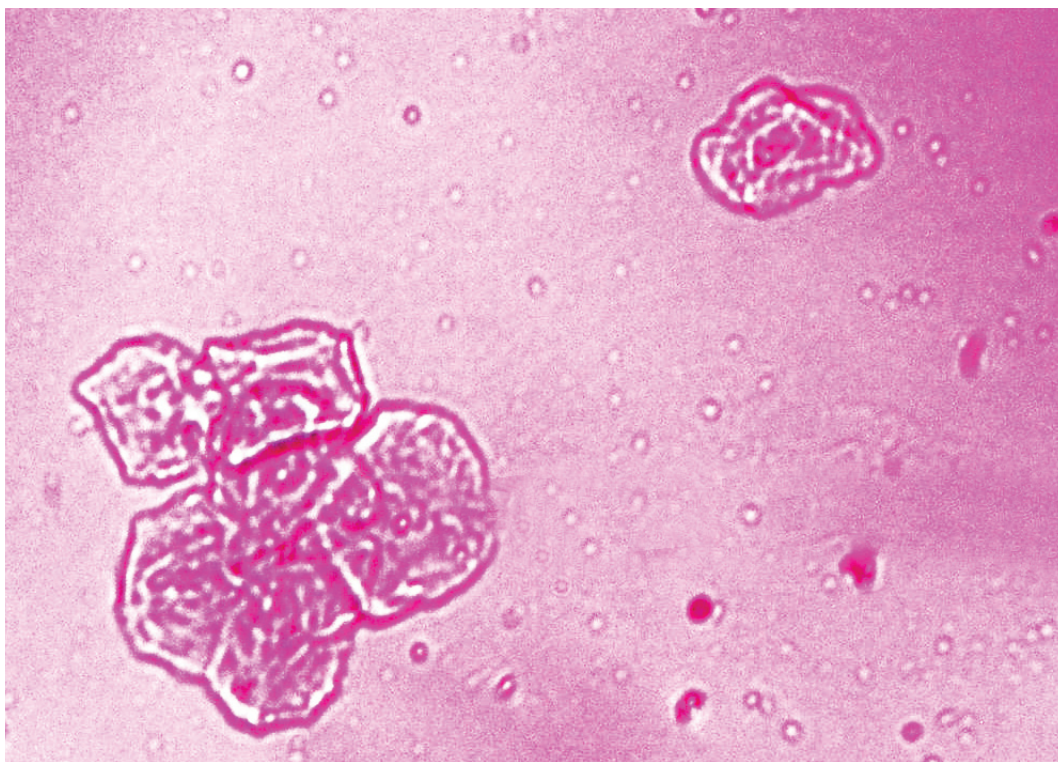


Рис. 3. Влагалищный мазок крысы. Стадия эструса. Окраска метиленовым синим. Ув. 200.

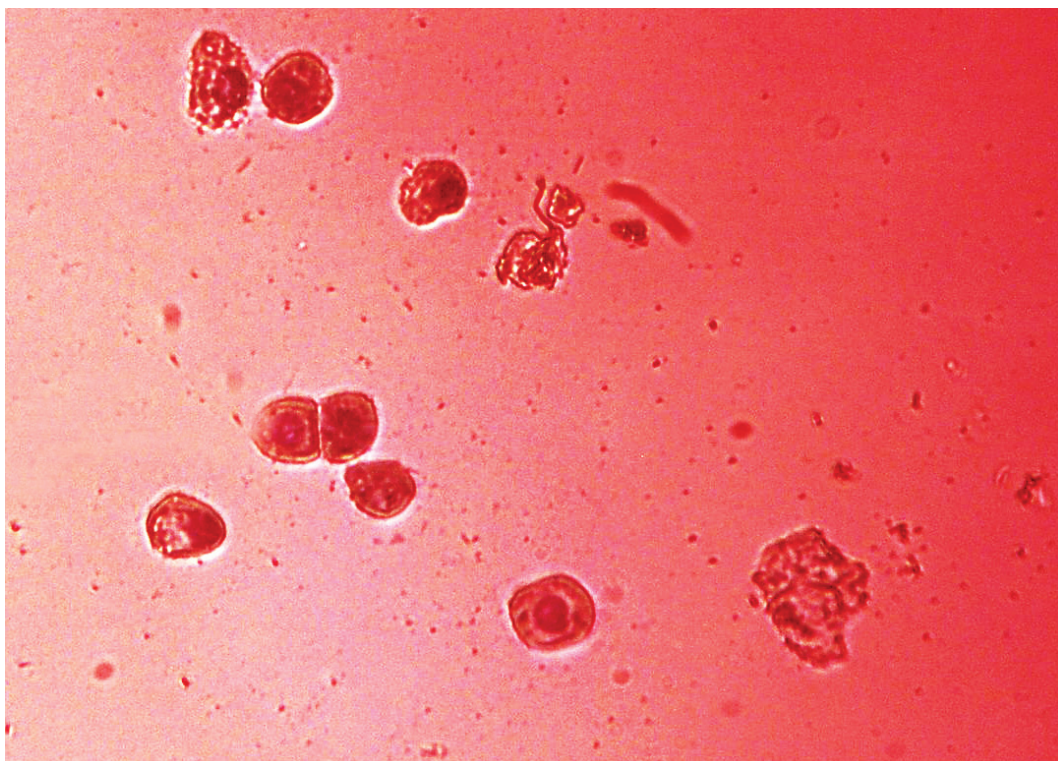


Рис. 4. Влагалищный мазок крысы. Стадия метаэструса. Окраска метиленовым синим. Ув. 200.

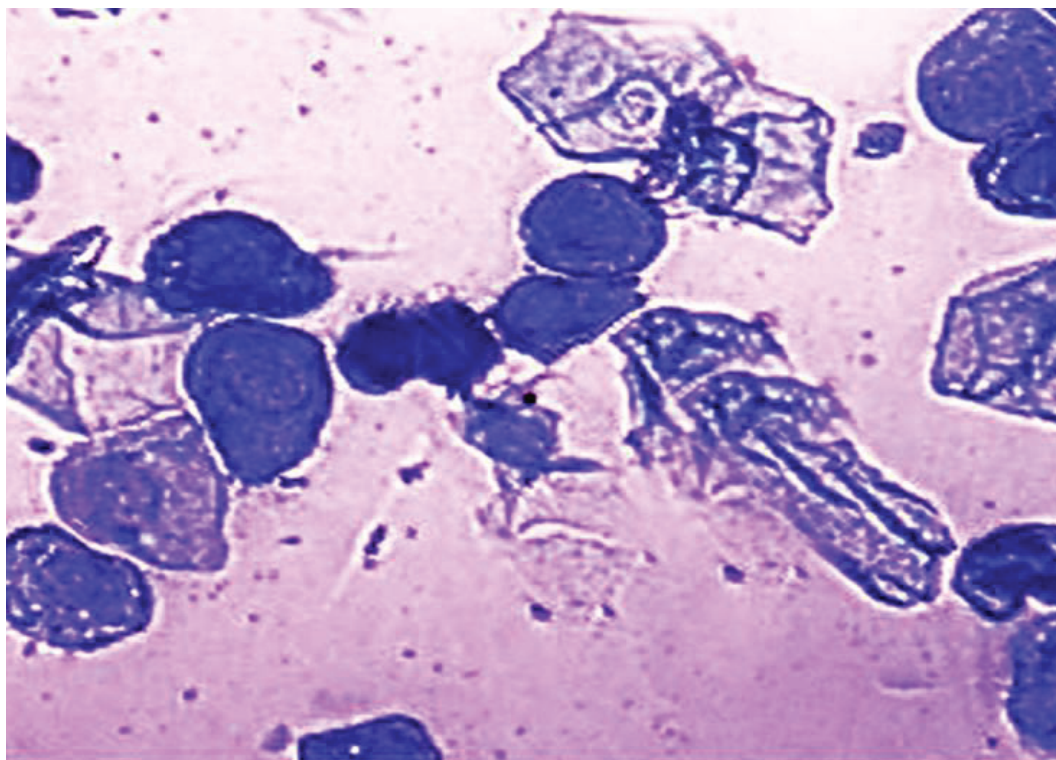


Рис. 5. Влагалищный мазок крысы на 8-9-й день после введения блокатора кисспептинергических рецепторов. Окраска метиленовым синим. Ув. 200.

пептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt в фазу диэструса у всех 18 животных было отмечено нарушение регулярного эстрального цикла, что выражалось в удлинении фазы диэструса в 3-4 раза по сравнению с исходными значениями. Введения физиологического раствора в аналогичный период к изменению эстрального цикла не приводило (схема 2).

Кроме этого было отмечено появление во влагалищных мазках крыс после пролонгированной фазы диэструса смешанной цитологической картины (на 8-9-й день после введения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt), что выражалось в одновременном появлении клеточных элементов, характерных для различных фаз эстрального цикла при наличии большого количества слизи (рис. 5).

Дальнейшее наблюдение за животными из опытной группы на протяжении 7 дней показало нормализацию цитологической картины содержимого влагалища и восстановление обычного эстрального цикла. Это объяснялось, на наш взгляд, физиологическим ресинтезом кисспептинергических рецепторов и восстановлением регуляции эстрального цикла со стороны кисспептина.

Выводы:

1. Кисспептин оказывает регулирующее влия-

ние на эстральный цикл крыс.

2. Блокада кисспептинергических рецепторов приводит к длительному нарушению эстрального цикла, заключающегося в исчезновении фазы овуляции.

3. Снижение влияния кисспептина на репродуктивную сферу крыс приводит к развитию вторичного бесплодия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Matsui H., Tanaka A., Yokoyama K., Takatsu Y. et al. Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KISS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153. – N 11. – P. 5297–5308.
2. Matvienko M. G., Pustovalov A. S., Dzerzhinsky N. E. Variety of functions and effects of kisspeptin // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29. – N 1. – P. 11–20
3. Oakley, Amy E., Clifton, Donald K., Steiner, Robert A. Kisspeptin Signaling in the Brain // *Endocrine Reviews*. – 2009. – Vol. 30. – №6. – P. 713–743.
4. Ong, K.K., Emmett, P., Northstone et al. Infancy weight gain predicts childhood body fat and age at menarche in girls. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – №94 – P. 1527–1532.
5. Woller, M.J., Tannenbaum, P.L., Schultz-Darken,

N.J., Eshelman, B.D., Abbott, D.H. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from hypothalamic explants of male marmoset monkeys compared with male rats. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2010. - №298. - R70–R78.

Авторская справка:

1. Зарубина Елена Григорьевна - заведующая кафедрой медико-биологических дисциплин НОУ

ВПО МИ «Реавиз», профессор, доктор медицинских наук. E-mail: e-zarubina@yandex.ru

2. Лысова Анна Николаевна - клинический ординатор кафедры акушерства и гинекологии НОУ ВПО МИ «Реавиз». E-mail: lysovaann@mail.ru

3. Беляков Владимир Иванович - к.м.н. доцент кафедры медико-биологических дисциплин НОУ ВПО МИ «Реавиз». E-mail: vladbelakov@mail.ru