

## ЭФФЕКТЫ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СУБТОКСИЧЕСКОЙ ДОЗЫ СИНЕСТРОЛА НА ЯИЧНИКИ ПОТОМСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Сулайманова Р.Т.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия, e-mail: rimma2006@bk.ru

## EFFECTS OF THE PRENATAL INJECTION TO LABORATORY MICE OF THE SYNESTROL SUBTOXIC DOSE ON OVARIES OF THE OFFSPRING

Sulaymanova RT

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, e-mail: rimma2006@bk.ru

### Для цитирования:

Сулайманова Р.Т. Эффекты пренатального воздействия субтоксической дозы синестрола на яичники потомства лабораторных мышей. Морфологические ведомости. 2020;28(1):37-42. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(1\):37-42](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(1):37-42)

### For the citation:

Sulaymanova RT. Effects of the prenatal injection to laboratory mice of the synestrol subtoxic dose on ovaries of the offspring. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2020;28(1):37-42. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(1\):37-42](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(1):37-42)

**Резюме.** Последние исследования, в которых анализируются цитотоксическое и про-канцерогенное действие эстрогенов, свидетельствуют о повышении риска заболеваемости раком яичников у тех пациентов, которым они вводятся и не исключают влияния избыточного гормонального фона на формирование морфофункциональных изменений тканей и органов у будущего потомства. Цель исследования – изучить эффекты пренатального воздействия субтоксической дозы синестрола на общую морфологию, гистометрические и иммуногистохимические показатели яичников потомства лабораторных мышей в постнатальном репродуктивном периоде онтогенеза. Беременные самки лабораторных мышей были поделены на 3 группы. Контрольной группе животных однократно вводили оливковое масло в дозе 0,2 мг/кг внутримышечно. Первая экспериментальная группа животных однократно внутримышечно получала синестрол в дозе 25 мг/кг в виде 2% масляного раствора, вторая группа – однократно внутримышечно синестрол в субтоксической дозе 40 мг/кг в виде 2% масляного раствора. Всем беременным самкам мышей препараты вводили на стадии гестации E11.5. Гистологическое исследование препаратов яичников потомства первой экспериментальной группы мышей показало изменение соотношения площади коркового вещества по отношению к площади мозгового с уменьшением числа фолликулов на разных стадиях развития по сравнению с аналогичными показателями потомства контрольной группы животных. Внутримышечное однократное введение синестрола в дозе 40 мг/кг у потомства второй экспериментальной группы привело к увеличению площади коркового и мозгового веществ в яичниках, уменьшению количества примордиальных, первичных (униламнарных) фолликулов в отличие от показателей яичников в контрольной группе. В гистологических срезах яичников второй экспериментальной группы наблюдалась гипертрофия и гиперплазия гранулезных клеток, а также тека интерна фолликулов. В корковом веществе отмечалось появление атретических тел, очаговой лютеинизации, свидетельствующих о существенном пренатальном воздействии гормона на постнатальную структуру органа. Снижение активности маркеров клеточной пролиферации, транскрипционного фактора p53 анти-онкогена свидетельствовало о повреждении функций яичников на уровне их молекулярно-генетических предикторов. Результаты исследования в целом показали, что воздействие субтоксической дозы синестрола на стадии E11.5 пренатального периода развития потомства лабораторных мышей приводит к стойким морфологическим изменениям в их яичниках в постнатальном репродуктивном периоде онтогенеза.

**Ключевые слова:** синестрол, яичники, лабораторные мыши, пренатальный эффект

**Summary.** Recent studies that analyze the cytotoxic and pro-carcinogenic effects of estrogens indicate an increased risk of ovarian cancer in those patients which are treatment and do not exclude the effect of excessive hormonal levels on the formation of morphological and functional changes in tissues and organs in future offspring. The aim of the study was to study the effects of the prenatal effects of subtoxic doses of synestrol on the general morphology, histometric and immunohistochemical parameters of the ovaries of the offspring of laboratory mice in its postnatal reproductive period of ontogenesis. Pregnant female laboratory mice were divided into 3 groups. The control group of animals was once injected olive oil at a dose of 0,2 µg/kg intramuscularly. The first experimental group of animals was injected intramuscularly a single dose of synestrol at a dose of 25 µg/kg in the form of a 2% oil solution, the second experimental group was injected intramuscularly once a single subtoxic dose of synestrol of 40 µg/kg in the form of a 2% oil solution. All pregnant female mice were treatment drugs at the gestational stage of E11.5. A histological study of the preparations of the ovaries of the offspring of the first experimental group of mice showed a change in the ratio of the area of cortical substance relative to the area of the medullar substance with a decrease in the number of follicles at different stages of development compared with similar indicators of the offspring of the control group of animals. A single intramuscular injection of synestrol at a dose of 40 µg/kg in the offspring of the second experimental group led to an increase in the area of cortical and medullar substances of the ovaries, a decrease in the number of primordial, primary (unilaminar) follicles, in contrast to the ovaries of the control group. In histological sections of the ovaries of the second experimental group, hypertrophy and hyperplasia of granulosa cells, as well as theca interna follicles were observed. The appearance of atretic bodies, focal luteinization, indicating a real prenatal effect of the hormone on the postnatal structure of the organ, was noted in the cortical substance. A decrease in the activity of markers of cell proliferation, the transcription factor p53 of an anti-oncogene,

indicated damage to ovarian functions at the level of their molecular genetic predictors. The results of the study generally showed that the effect of a subtoxic dose of synestrol at stage E11.5 of the prenatal period of development of the offspring of laboratory mice leads to persistent morphological changes in their ovaries in the postnatal reproductive period of ontogenesis.

**Keywords:** *synestrol, ovaries, laboratory mice, prenatal effect*

**Введение.** Условия жизни плода млекопитающих и человека во время беременности зависят от действия внутренних факторов и окружающей среды. Уровень материнских и плацентарных гормонов является ключевым фактором, влияющим на репродуктивное здоровье потомства в зрелом возрасте [1-2]. Неблагоприятные факторы обладают долгосрочными эффектами, приводя к нарушениям функций и аномалиям репродуктивной системы у потомства в постнатальном периоде [3-4]. Стрессовый уровень гормонов матери на плод отражается, в том числе и на органах репродуктивной системы потомства [5]. Ткани и клетки репродуктивных органов-мишеней не могут не изменяться под действием колебаний гормонального фона [6-7]. Анализ литературных источников показывает, что избыточное пренатальное гормональное воздействие приводит к нарушениям в органах-мишенях, таких как молочная железа, эндометрий, эпителий маточных труб, яичников у потомства [8-11]. Колебания уровня гормонов могут привести к необратимым метаболическим, гормональным, морфологическим изменениям, программированию и дальнейшему девиантному развитию органов и систем в постнатальном онтогенезе. Пренатальное программирование во время критического периода «открытого окна» переносит патологию на генетический и клеточный уровни, которые, в свою очередь, во взрослой жизни вызывают развитие соматических заболеваний и заболеваний репродуктивной системы, различные их проявления в зрелом периоде жизни [12-13]. Степень разрушающего эффекта зависит не только от величины уровня гормонального воздействия, но также и от времени и продолжительности критического периода воздействия [14-15]. Поэтому практически значимым остается вопрос изучения развития яичников в условиях воздействия различного уровня гормонального фона материнского организма на потомство женского пола в период пренатальной закладки и формирования органа.

**Цель исследования:** изучение пренатального воздействия субтоксической дозы синестрола на морфологию, гистометрические и иммуногистохимические показатели яичников потомства в зрелом репродуктивном периоде онтогенеза.

**Материалы и методы исследования.** В качестве экспериментальных животных использовали самок белых лабораторных мышей (n=9) массой 19-21 г, которые были получены в питомнике лабораторных животных (Горный Чишминского района Республики Башкортостан). Условия вивария и содержания животных соответствовали «Методическим рекомендациям по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений», другим санитарным нормам и требованиям ветеринарного контроля и надзора для работ с лабораторными и экспериментальными животными. После фертилизации беременных самок лабораторных мышей разделили на 3 группы (одна контрольная группа, две экспериментальные группы), которым на стадии гестации E11.5 было выполнено внутримышечное однократное введение различных доз 2% масляного раствора синтетического препарата эстрогена синестрола. Расчеты эффективности и токсичности доз препарата производили в соответствии с коэффициентами для перерасчета доз веществ в мкг/кг для лабораторных мышей [16-18]. Контрольная группа (n=3) получала оливковое масло в дозе 0,2 мкг/кг однократно внутримышечно. Первая экспериментальная группа «С25» (n=3) получала синестрол однократно в виде 2% масляного раствора в дозе 25 мкг/кг внутримышечно. Вторая экспериментальная группа «С40» (n=3) получала синестрол однократно в виде 2% масляного раствора в субтоксической дозе 40 мкг/кг массы внутримышечно. Исследовали яичники полученного потомства женского пола по достижению середины репродуктивного возраста. По достижению потомством постнатального возраста 90 дней всех животных (n=15, по пять животных, рожденных от самок каждой группы) выводили из опыта в одну и ту же

фазу эстрального цикла – в фазу диэструса, в соответствии с условиями, предъявляемыми Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. и рекомендациями других международных, российских и институциональных правил в области биоэтики. Для определения фазы эстрального цикла использовали влагиалищные мазки, окрашенные по Романовскому и критерии, предложенные Cora et al. [19]. Для исследования извлекали яичники. Органы фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалина в течение 24 часов, затем подвергали стандартной гистологической обработке. Готовили стандартные срезы толщиной 4 мкм, после соответствующей гистологической проводки производилось окрашивание гематоксилином-эозином и иммуногистохимическими методами. Срезы окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В работе в качестве первых антител были использованы поликлональные антитела для мыши Santa Cruz Biotechnology (США), к рецептору p53 (клон fl-393-G) использовали антитела в разведении 1:300. Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Докраску проводили раствором гематоксилина. Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Исследование, визуализацию и измерения гистологических препаратов проводили с использованием инвертированного биологического микроскопа Axio Observer D1 (компания-производитель Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Проводились следующие измерения гистометрических показателей яичников: площади тотального срединного среза в стандартно однотипной ориентации органа, площади коркового вещества, площади мозгового вещества, площади желтых тел. Также было исследовано количество фолликулов на разных стадиях развития: примордиальные, первичные (униламнарные), вторичные (мультиламнарные), третичные с дальнейшим сравнением полученных результатов с контрольной группой. Для сравнения использовались статистические методы анализа относительных величин.

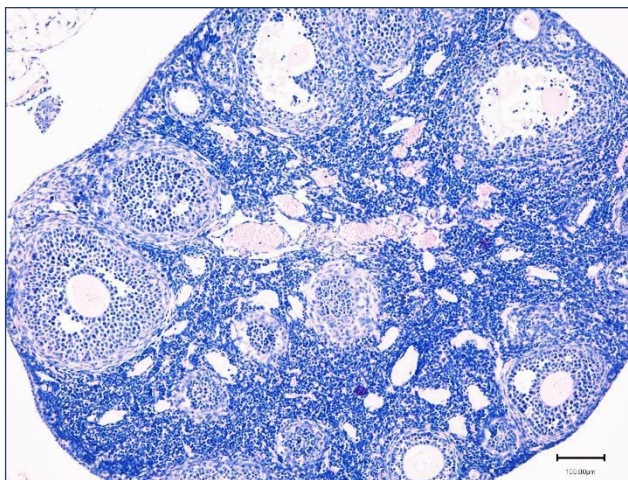
**Результаты и обсуждение.** Введение оливкового масла в дозе 0,2 мкг/кг, являющегося растворителем синтетического препарата синестрола, однократно внутримышечно контрольной группе беременных самок мышей не приводило к существенным изменениям в морфологической структуре яичников потомства в зрелом репродуктивном возрасте и не отличалось от структуры яичников лабораторных мышей в норме, детально описанным в литературе (рис. 1). Иммуногистохимическая реакция на маркер p53 была наиболее выражена в фолликулярном эпителии и структурах мозгового вещества яичника (рис. 2).

В результате однократного внутримышечного введения синестрола в дозе 25 мкг/кг беременной мыши было получено потомство женского пола, у которого отмечались изменения гистометрических показателей коркового и мозгового веществ яичников в зрелом репродуктивном возрасте. Площадь коркового вещества яичников потомства экспериментальной группы «С25» увеличилась на 12,5% по сравнению с контрольной группой животных, также наблюдалось увеличение в 2,6 раза площади тотального срединного среза в стандартно однотипной ориентации органа (рис. 4). Площадь мозгового вещества и средняя площадь желтых тел снизились по сравнению с аналогичными показателями яичников контрольной группы животных на 33,3% и 40,0% соответственно. Изменения коснулись и числа всех видов фолликулов яичника на единицу площади. По сравнению с яичниками контрольной группы животных число примордиальных фолликулов снизилось в 7,6 раза, первичных (униламнарных) фолликулов на 12,5%, а вторичных (мультиламнарных) и третичных фолликулов на 42,8% и 28,5%, соответственно (рис. 3). В фолликулах яичников потомства первой экспериментальной группы животных определялись единичные очаги яркой экспрессии маркера p53 до 9-10% клеток, в строме органа – яркая экспрессия p53 до 5% клеток (рис. 4).

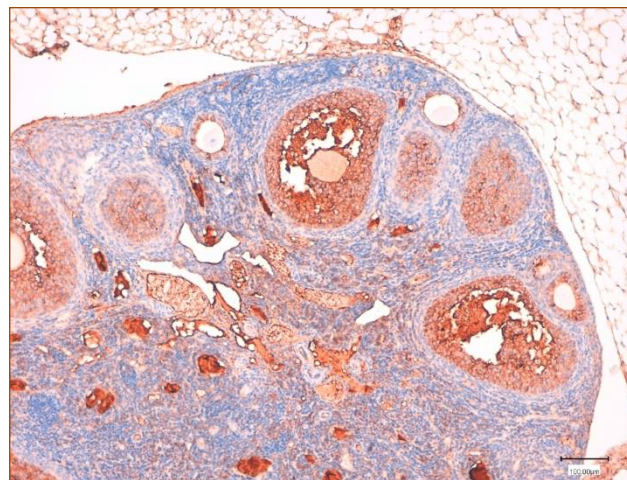
В результате однократного внутримышечного введения синтетического препарата синестрола в субтоксической дозе 40 мкг/кг беременным мышам второй



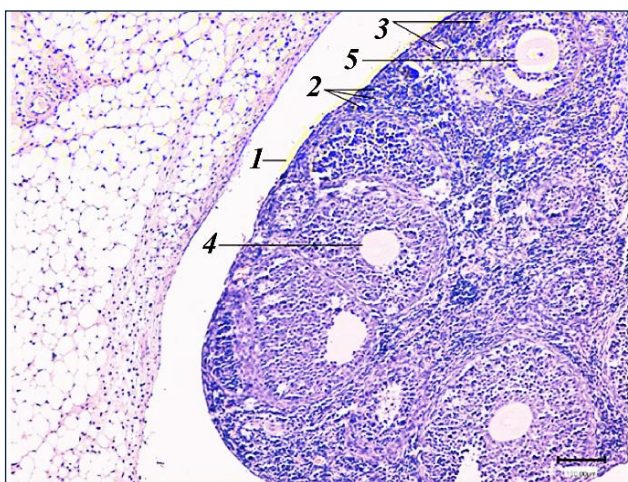
экспериментальной группы в яичниках их потомства в зрелом репродуктивном возрасте отмечались значительные изменения гистометрических показателей площадей коркового и мозгового вещества (рис. 5). Эти морфологические изменения проявились в увеличении площади тотального срединного среза яичника по сравнению с контрольным значением в 2,3 раза.



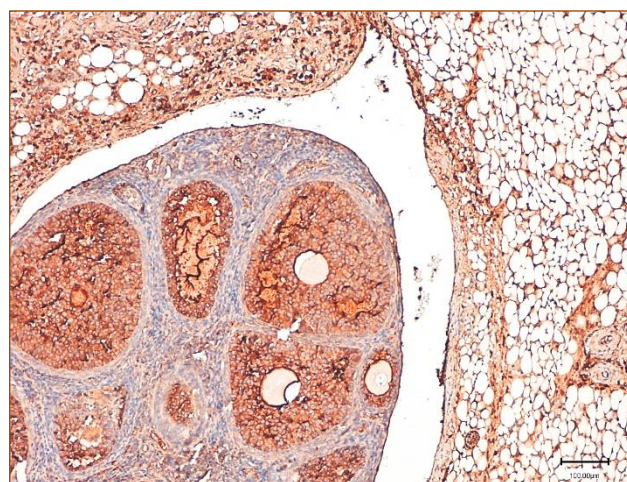
**Рис. 1.** Микрофото препарата яичника потомства контрольной группы животных. Окр. гематоксилином-эозином. Ув.: 100.



**Рис. 2.** Микрофото препарата яичника потомства мыши контрольной группы. Иммуногистохимическая реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. Ув.: x100.



**Рис. 3.** Микрофото препарата яичника потомства мыши с введением во время беременности синестрола в дозе 25 мкг/кг («С25»). 1 - герминативный эпителий, 2 – примордиальный фолликул, 3 – первичный (униламнарный) фолликул, 4 - вторичный (мультиламнарный) фолликул, 5 – третичный фолликул. Окр. гематоксилином-эозином. Ув.: x100.

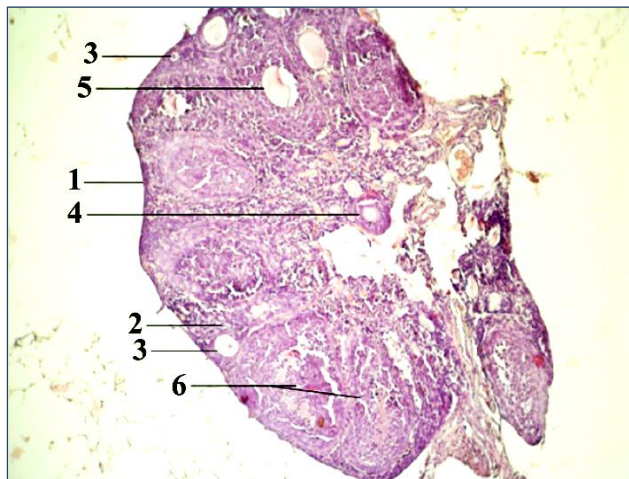


**Рис. 4.** Микрофото препарата яичника потомства мыши группы «С25». Иммуногистохимическая реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. Ув.: x100.

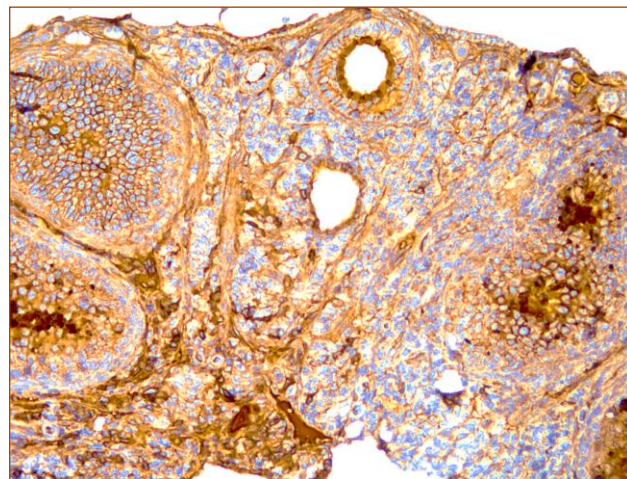
Площадь коркового вещества также подверглась существенным изменениям в виде увеличения ее в 2,5 раза. Изменения коснулись и числа всех видов фолликулов яичника по



сравнению с их количеством в яичниках потомства контрольной группы (рис. 5). Количество примордиальных фолликулов снизилось в 7,4 раза по сравнению с яичниками контрольной группы, первичных (униламинарных) фолликулов в 6,2 раза. Количество вторичных (мультиламинарных) и третичных фолликулов увеличилось на 71,4% и 57,1% соответственно, в исследуемых гистологических препаратах наблюдалась гипертрофия и гиперплазии гранулезных клеток, а также *teca interna*.



**Рис. 5.** Микрофото препарата яичника потомства мыши с введением во время беременности синестрола в дозе 40 мкг/кг («С40»). 1 - герминативный эпителий, 2 - примордиальный фолликул, 3 - первичный (униламинарный) фолликул, 4 - вторичный (мультиламинарный) фолликул, 5 - третичный фолликул. Окр. гематоксилином-эозином. Ув.:  $\times 100$ .



**Рис. 6.** Микрофото препарата яичника потомства мыши группы «С40». Иммуногистохимическая реакция на маркер p53. Докраска ядер гематоксилином. Ув.:  $\times 200$ .

В строме коркового вещества наблюдалась очаговая лютеинизация. Относительные площади мозгового вещества и желтых тел показали значительный рост в 1,64 раза и 2,76, соответственно (рис. 5). Яркая экспрессия маркера p53 до 14-15% клеток определялась в созревающих фолликулах, в строме яичника наблюдалась умеренная экспрессия до 7% клеток, в желтых телах выявлена сильная положительная реакция на исследованный маркер в единичных клетках (рис. 6).

**Заключение.** Таким образом, однократная внутримышечная инъекция масляного раствора терапевтической и субтоксической дозы синтетического препарата синестрола беременным самкам лабораторных мышей на стадии гестации E11.5 на этапе закладки яичников приводит к стойким морфологическим изменениям у потомства в постнатальной жизни. При использовании субтоксической дозы 40 мг/кг структурные изменения являются более выраженными, а иммуногистохимические исследования активности маркера p53 свидетельствуют о возможном ее проканцерогенном эффекте. Обнаруженные изменения следует рассматривать как морфологические предикторы нарушений функций яичников в снижении фертильности, а также косвенно, как предикторы проканцерогенных эффектов на яичники потомства. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об актуальности проблемы лимитирования генотоксического и токсического воздействий вводимых в организм эстрогенов в период беременности для предотвращения неблагоприятных эффектов на развитие репродуктивной системы потомства.

Авторы сообщают об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.

Литература  
References

1. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008;(359):61-73.
2. Sulaymanova RT, Akhmetova ND, Islamgareeva DO. *Izmeneniya morfologii jaichnikov laboratornykh myshey pri prenatal'nom vozdeystvii jestrogenov.* Ulyanovsk: Anatomicum Latinicumque: nauch. al'm. pod. red. prof. R.M. Khayrullina; 2017:186-188s.
3. Khayrullin RM, Sulaymanova RT, Sulaymanova LI, Bakhtiyarov RI. *Dizraptory kak jekologicheskij factor riska opuholey reproduktivnoj sistemy.* Ulyanovsk: Mediko-fiziologicheskie problemy jekologii cheloveka. Mater. V Vseross. konf. s mezhdunar. uchast. Ulyanovsk: UIGU, 2014. 193-195s.
4. Khayrullin P.M., Tikhonov D.A., Mirin A.A., Svitaylo M.P. *Anatomo-antropologicheskie pokazateli fizicheskogo razvitiya i reproduktivnogo zdorov'ya yunoshey.* *Morfologiya.* 2009;136(4);146a.
5. Yusupova LR, Sulaymanova RT, Khayrullin RM, Sulaymanova LI. *Somatometric and behavioral characteristics of the mice offspring in early postnatal development which was prenatally treatment with fulvestrant.* *Revista Argentina De Anatomía Clínica.* 2014;6(2):134.
6. Abbott DH, Padmanabhan V, Dumesic DA. *Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction.* *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:17.
7. Dudenkova NA, Shubina OS. *Morfofunktsional'nyye izmeneniya zheltogo tela v yaisnikakh belykh kryss pri vozdeystvii atsetata svintsa.* *Biotechnology and medicine science prospects.* 2015;9(72):114-122.
8. Yusupova LR, Sulaymanova RT, Magadeev TR, Gafurova AF, Zaripova RI, Haziev AR, Sulaymanova LI, Kometova VV, Khayrullin RM. *O faktore riska razvitiya raka molochnoj zhelezy, svyazannom s prenatal'nym obmenom estrogenov.* *Fundamental'nye issledovaniya.* 2013;10(1):130-135.
9. Khayrullin RM, Sulaymanova RT, Sulaymanova LI, Gnijatullina GA, Sharafutdinova JR. *Prokancerogenneye efekty subtoksicheskikh doz sinjestrola na jaichniki potomstva u laboratornykh myshey.* *Morfologiya.* 2018;153(3):289-290.
10. Khayrullin RM, Sulaymanova RT, Bakhtiyarov RI, Yusupova LR, Fomina AV. *Comparative prenatal effects of sex steroids on anogenital distance of the offspring of laboratory mice.* *Bratislava: The 7th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy Book of abstracts ISCAA; 2015:140s.*
11. Sulaymanova R.T. *Eksperimental'nyye modeli transgeneratsionnykh effektov vliyaniya estrogenov na morfologiyu reproduktivnykh organov potomstva v postnatal'nom ontogeneze.* *Morfologicheskie vedomosti.* 2019;27(1):37.
12. Ryzhavskiy B.Y. *Sostoyaniye vazhneyshikh sistem v embriogeneze: otdalennyye posledstviya.* Khabarovsk, 1999. 203s.
13. Barker DJ. *In utero programming of chronic disease.* *Clin Sci (Lond).* 1998;95:115-128.
14. Khayrullin R.M., Fomina A.V., Sulaymanova R.T., Aynullova N.K. *Effect of prenatal androgenization at the finger length and 2d:4d digit ratio of laboratory mice.* *Revista Argentina de Anatomía Clínica.* 2013;5(2):124.
15. Khayrullin Rm., Sulaymanova Rt., Bakhtiyarov Ri., Yusupova Lr., Fomina Av. *Comparative prenatal effects of sex steroids on anogenital distance of the offspring of laboratory mice.* In Book: *The 7th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy Book of abstracts.* Bratislava, 2015. P. 140.
16. Arzamastsev E.V., Gus'kova T.A., Berezovskaya I.V. i dr. *Metodologicheskiye ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deystviya farmakologicheskikh veshchestv.* Moskva: Meditsina, 2005. S. 41-54.
17. Khabriyev R.U. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv.* 2005. S. 49-51.
18. Gus'kova T.A. *Doklinicheskoye toksikologicheskoye izucheniye lekarstvennykh sredstv kak garantiya bezopasnosti provedeniya ikh klinicheskikh issledovaniy.* *Toksikologicheskij vestnik.* 2010;5(104):2-6.
19. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. *Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears.* *Toxicologic Pathology.* 2015;43(6):776-793.

#### Авторская справка

**Сулайманова Римма Тагировна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; e-mail: [rimma2006@bk.ru](mailto:rimma2006@bk.ru)