

РОЛЬ КИССПЕПТИНА В НОРМАЛИЗАЦИИ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА ВЗРОСЛЫХ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС

Зарубина Е.Г.¹, Лысова А.Н.¹

¹НОУ ВПО «Медицинский институт «Реавиз», Самара, Россия, e-zarubina@yandex.ru

На 47 половозрелых молодых самках крыс линии Wistar проводилось экспериментальное изучение влияния кисспептина на восстановление овуляторного эстрального цикла на фоне фармакологической блокады GPR54. На первом этапе исследования после синхронизации эстральных циклов животных каждой крысе в первый день диэструса в носовой ход вводили 10 мкл раствора (2×10^{-3} Моль) блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA) и изучалась ритмичность функционирования яичников животных путем оценки влагалищных мазков. На втором этапе исследования все животные с индуцированным ановуляторным состоянием были разделены на 2 подгруппы по 28 (контроль) и 29 (опыт) особей, после чего опытным животным внутрь носового хода вводили 10 мкл раствора kisspeptin-234 (2×10^{-2} Моль), а контрольным животным аналогичный объем 0,9%-ного раствора NaCl. Далее на протяжении 10 дней ежедневно оценивались влагалищные мазки крыс обеих подгрупп для уточнения характера влияния кисспептина на эстральный цикл животных. Установлено, что кисспептин оказывает регулирующее влияние на эстральный цикл крыс, восстанавливая фазу овуляции, и предотвращает развитие вторичного бесплодия.

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

KISSPEPTIN ROLE IN THE NORMALIZATION OF THE ESTROUS CYCLE OF MATURE FEMALES ADULT FEMALE RATS

Zarubina E.G.¹, Lysova A.N.¹

¹ Medical Institute «Reaviz», Samara, Russia, e-zarubina@yandex.ru

47 mature young female Wistar rats conducted an experimental study of the influence of Kisspeptin to restore ovulatory estrous cycle on the background of the pharmacological blockade of GPR54. At the first stage of the study after the synchronization of the estrous cycle of animals each rat on the first day of diestrus in the nasal passage introduced 10ml solution (2×10^{-3} Mole) kisspeptin - receptor blocker - kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA) and studied the rhythm of ovarian function by evaluating vaginal animals smears. The second phase of the study, all animals with anovulatory state were divided into 2 subgroups 28 (control) and 29 (experience) individuals. The test animals was injected into the nasal passage 10 ul kisspeptin-234 (2×10^{-2} Mole) and to control animals similar volume of 0.9% solution of NaCl. Further, for 10 days daily vaginal smears were assessed in rats of both subgroups to clarify the nature of the effect on the estrous cycle Kisspeptin animals. It was established that Kisspeptin has a regulating effect on the estrous cycle of rats, restoring ovulation phase, and prevents the development of secondary infertility.

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

Одной из главных причин женского бесплодия является нарушение процессов овуляции. В 20% случаев причиной этого является дисфункция яичников, которая приводит к нарушению выработки гормонов, происходящих в системе гипоталамус-гипофиз [1]. Когда нарушена деятельность этой системы, в яичники просто не поступают соответствующие сигналы, в связи с этим нарушается ритмичная выработка гормонов. Лютеинизирующий гормон (ЛГ - гипофизарный гормон, являющийся регулятором менструального цикла и выработки половых гормонов женщины) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ или фоллитропин - гипофизарный гормон, выступающий в роли регулятора развития овариальных фолликулов в организме женщины) вырабатываются в недостаточных для

нормального развития зрелых яйцеклеток количествах. В настоящее время установлено, что одним из регуляторов выработки ЛГ и ФСГ является открытый в 1999 году нейрогормон кисспептин [2]. Он увеличивает активность клеток гипоталамуса, выделяющих гормон гонадолиберин, а тот уже, в свою очередь, оказывает влияние на уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), от которых и зависит возникновение овуляции, а, следовательно, возможность зачатия. Однако до настоящего времени достоверно не установлено, как влияют колебания его уровня на уже сформировавшуюся и нормально функционирующую репродуктивную сферу [5].

Целью данной работы стало изучение влияния кисспептина на восстановление нормального эстрального цикла у крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на 47 половозрелых молодых самках крыс (возраст 5 месяцев) линии Wistar, весом $167,0 \pm 11,0$ г с учётом Правил лабораторной практики в РФ и директив Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Strasbourg, 1986). На первом этапе исследования после синхронизации эстральных циклов животных каждой крысе в первый день диэструса в носовой ход вводили 10 мкл раствора (2×10^{-3} Моль) блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA) и 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 млекопитающих соответствует определенная клеточная картина влагалищных выделений. Забор материала осуществлялся ежедневно на протяжении 4 недель с помощью марлевого тампона. Мазки анализировались на микроскопе «Микмед» (2011) при увеличении 10x20, оснащённом цифровой насадкой для компьютерной визуализации изображения после окраски 0,5%-ным спиртовым раствором метиленового синего. При цитологической оценке влагалищных мазков крыс применялась упрощённая классификация Geist, Salmon и определялись 2 индекса: индекс созревания (ИС) и кариопикнотический индекс (КИ). ИС (числовой индекс, индекс зрелости) представляет собой процентное отношение трех видов эпителиальных клеток — базальных/парабазальных, промежуточных и поверхностных. КИ (кариопикнотический индекс) — процентное отношение поверхностных клеток с пикнотическими ядрами к общему числу клеток в мазке. При этом установлено, что увеличение в мазках количества поверхностных клеток или клеток с пикнотическими ядрами соответствует повышенной эстрогенной стимуляции. Кроме этого, до и после введения блокатора кисспептинергических рецепторов у подопытных животных измерялась ректальная температура. На втором этапе исследования все животные с индуцированным ановуляторным состоянием были разделены

на 2 подгруппы по 28 (контроль) и 29 (опыт) особей, после чего опытным животным внутрь носового хода вводили 10 мкл раствора kisspeptin-234 (2×10^{-2} Моль), а контрольным животным аналогичный объем 0,9%-ного раствора NaCl. Далее на протяжении 10 дней ежедневно оценивались влагалищные мазки крыс обеих подгрупп для уточнения характера влияния кисспептина на эстральный цикл животных.

Полученные результаты и их обсуждение

Изучение эстрального цикла крыс до введения блокатора кисспептинергических рецепторов показало наличие у всех животных нормального овуляторного цикла, включающего 4 фазы: диэструс (стадия покоя, или межтечки); проэструс (стадия подготовки к течке, или предтечки); эструс (течка); метэструс (стадия послетечки) [3]. Подтверждением этого стали данные цитологического исследования влагалищных мазков и индексов в зависимости от фазы цикла (табл. 1).

Таблица 1

Кольпоцитологические индексы у крыс линии Wistar до применения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA)

Показатель	Диэструс	Проэструс	Эструс	Метэструс
ИС	0/0/0	0/24/76	0/15/85	65/25/10
КИ	9,6±3,6	75,6±7,2	81,7±6,2	25,6±5,3
Эстрогенная стимуляция	↓↓↓	↑↑	↑↑↑	↓↓

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

Эти данные подтверждались и динамикой изменения ректальной температуры у крыс в период эстрального цикла. Поскольку эстрогены способствуют снижению ректальной температуры, а прогестерон – ее повышению, то в первой фазе цикла она низкая, а во второй – высокая. Непосредственно перед овуляцией наблюдается всплеск эстрогенов, что обеспечивает еще большее снижение температуры. Таким образом, в идеале ректальная температура при овуляции должна быть самой низкой на графике. Нормальная ректальная температура у крыс в эксперименте составляла в среднем 38,0-38,1 °С, однако в фазу эструса (иногда проэструса) она снижалась до 36,9±0,2 °С (рис. 1), что свидетельствовало о произошедшей овуляции. Выявлено было также достоверное повышение температуры в фазу диэструса (до 38,8-38,9 °С) по сравнению с фазой эструса, что объяснялось затухающим функционированием желтых тел в период диэструса.

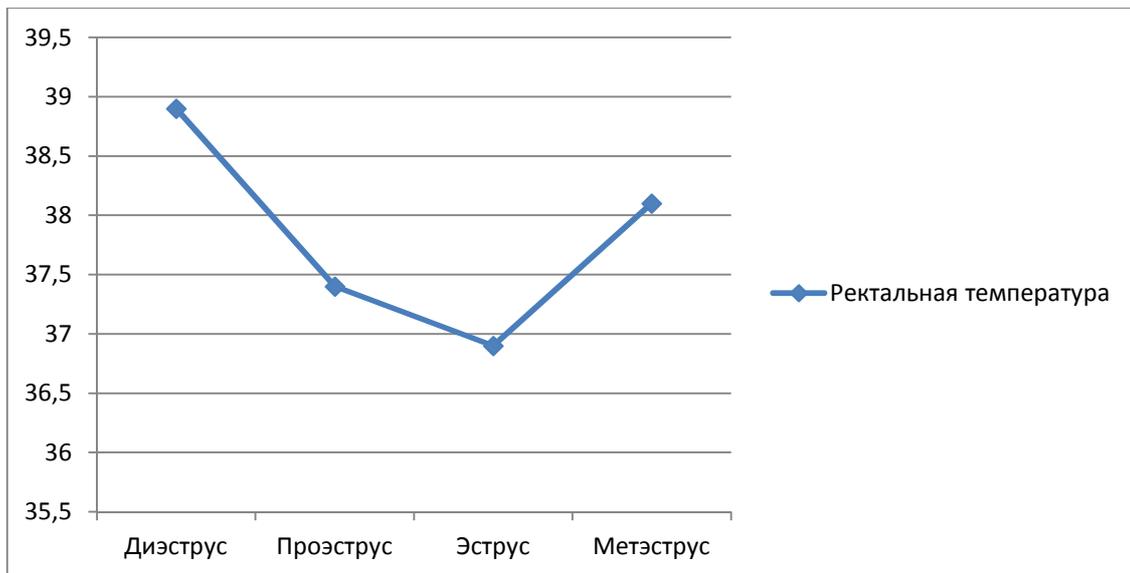


Рис. 1. Динамика изменения базальной температуры у крыс с нормальным эстральным циклом.

После введения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA) - измерение базальной температуры у крыс показало изменение характера температурной кривой, которая стала фактически монофазной (разница базальной температуры не превышала на протяжении цикла 0,2 °C), что косвенно свидетельствует об отсутствии овуляции у самок крыс на фоне введения блокатора кисспептинергических рецепторов.

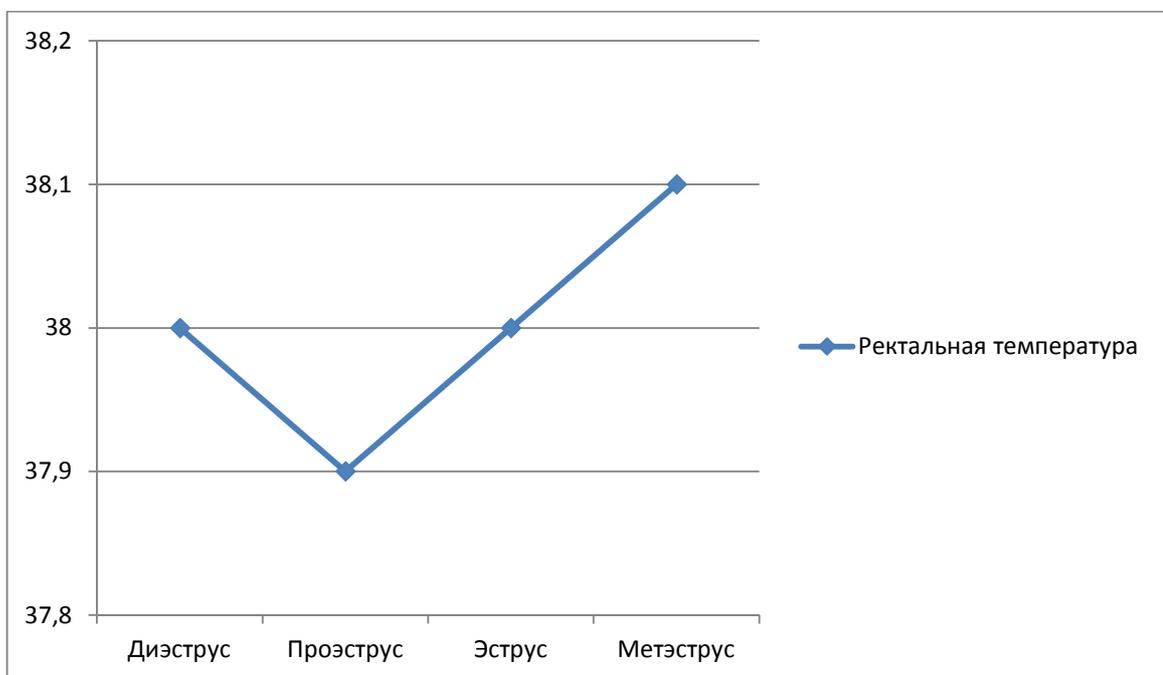


Рис. 2. Динамика базальной температуры крыс на фоне введения блокатора кисспептинергических рецепторов.

Расчет индексов кольпоцитогаммы показал, что после блокады рецепторов к киспептину происходило нарушение уровня эстрогенной стимуляции в организме самок крыс, что подтверждало роль киспептина в регуляции эстрального цикла (табл. 2).

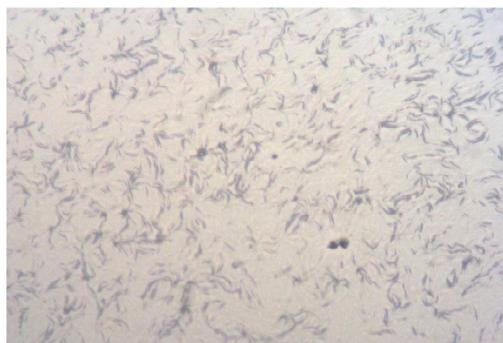
Таблица 2

Кольпоцитологические индексы у крыс линии Wistar после применения блокатора киспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetate salt (Sigma, USA)

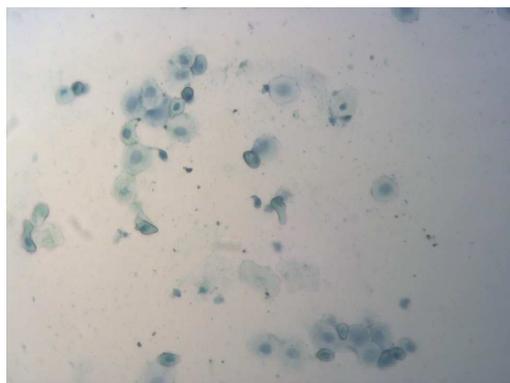
Показатель	Диэструс (продолженный), дни наблюдения после введения блокатора киспептинергических рецепторов				Смешанная цитологическая картина	
	1-й	3-й	5-й	7-й	9-й	11-й
ИС	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	30/34/36	10/23/67
Слизь	++	+++	+++	++	++	+
КИ	-	-	-	-	15,6±3,3	55,7±3,9
Эстрогенная стимуляция	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↑

После появления на фоне блокады киспептинергических рецепторов экспериментального ановуляторного бесплодия все животные разделялись на 2 подгруппы: первая – контрольная (28 крыс) и вторая – опытная группа (29 животных). На 5-е сутки 29 (2-я группа) крысам внутрь носового хода вводили 10 мкл раствора kisspeptin-234 (2×10^{-2} Моль), а 28 (1-я группа) животным аналогичный объем 0,9%-ного раствора NaCl. Далее на протяжении 10 дней ежедневно оценивались влагалищные мазки крыс обеих подгрупп для уточнения характера влияния киспептина на эстральный цикл животных.

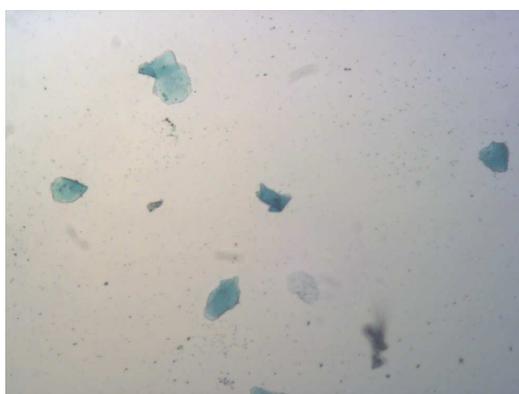
Было установлено, что введение киспептина самкам крыс первой подгруппы, на фоне диэструса, приводило к резкой активизации их репродуктивной сферы и возникновению в цитологической картине влагалища уже через 16 часов картины ярко выраженного эструса (рис. 3) с восстановлением исходных значений кольпоцитологических индексов. Одновременно восстанавливалась и нормальная динамика ректальной температуры крыс, что также косвенно свидетельствовало о восстановлении овуляторного цикла.



а



б



в

Рис. 3. Цитологическая картина влагалищного содержимого крыс 1-й группы, 10x20, окраска метиленовым синим: а – после введения блокатора ксисспептинергических рецепторов и до введения ксисспептина (диэструс); б - через 16 часов после введения ксисспептина (проэструс/эструс); в - через 24 часа после введения ксисспептина (эструс).

Введение физиологического раствора крысам второй подгруппы в аналогичный период к изменению эстрального цикла не приводило, что выражалось в удлинении фазы диэструса в 3-4 раза по сравнению с исходными значениями (в среднем до $9,8 \pm 1,4$ дней).

Полученные в ходе эксперимента данные согласуются с результатами исследований британских ученых (Waljit Dhillon, 2008. Источник: <http://medportal.ru/>. Опубликовано 18-03-2009), которые в ходе обследования 10 женщин выяснили, что гормон ксисспептин способен стимулировать выработку организмом половых гормонов, которые контролируют менструальный цикл [4]. У женщин, которым вводили ксисспептин, заметно повысился уровень ФСГ и ЛГ, что приводило к овуляции.

Данные проведенного нами экспериментального изучения роли кисспептина подтверждают не только его регулирующую роль в формировании регулярного эстрального цикла, но и открывают возможность восстановления его нарушений экзогенным введением кисспептина, что, возможно, в дальнейшем поможет в создании неинвазивных методов лечения бесплодия у женщин с нарушениями менструального цикла.

Выводы

1. Кисспептин оказывает регулирующее влияние на эстральный цикл крыс через нормализацию уровней половых гормонов.
2. Введение экзогенного кисспептина может способствовать восстановлению нормального полового цикла у самок крыс с восстановлением фазы овуляции.

Список литературы

1. Назаренко Т.А., Дуринян Э.Р., Чечурова Т.Н., Зыряева Т.А. Формы эндокринного бесплодия // Бесплодный брак. Руководство для врачей / под. ред. В.И. Кулакова. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. - С. 126-144.
2. Amy E. Oakley, Donald K. Clifton, and Robert A. Steiner Kisspeptin Signaling in the Brain. // *Endocr Rev.* – 2009. - Oct; 30 (6): 713–743.
3. Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis // *Mol Cell Endocrinol.* – 2006. - Jul 25; 254-255:91-6.
4. 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.
5. Meczekalski B., Podfigurna-Stopa A., Genazzani A.R. Why kisspeptin is such important for reproduction? // *Gynecol Endocrinol.* – 2011. - Jan; 27 (1):8-13. - doi: 10.3109/09513590.2010.506291. - Epub 2010 Jul 30.

Рецензенты:

Макурина О.Н., д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии, ФГБОУ ВПО «Самарский государственный университет», г. Самара;

Завалко А.Ф., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии, НОУ ВПО «Медицинский институт «Реавиз», г. Самара.