

УДК 591.16

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА У КРЫС И ЗНАЧЕНИЕ КИССПЕПТИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ЕГО РЕГУЛЯЦИИ

А. В. Локтаева, В. И. Беляков

В модельном эксперименте на половозрелых самках-крысах изучены особенности протекания эстрального цикла, проанализирована цитологическая картина влажлистных мазков на отдельных стадиях цикла (проэструс, эструс, диэструс). Отмечено изменение различных индексов кальпоцитогаммы по мере смены стадий эстрального цикла. В работе обобщаются сведения о значении компонентов кисспептинергической системы в обеспечении функционирования гормональной оси «гипоталамус–аденогипофиз–яичники».

Ключевые слова: эстральный цикл, эструс, проэструс, диэструс, кисспептин.

Как известно, репродуктивная функция организма находится под сложно организованным нейрогормональным контролем, в основе которого лежит функционирование гипоталамо-гипофизарно-гонадаальной системы [1]. Важное значение в регуляции функциональной активности данной системы принадлежит открытому в 1991 году гипоталамическому пептидному фактору – кисспептину [2]. Выработка кисспептина начинается с момента наступления полового созревания нейронами аркуатного и антеровентрального перивентрикулярного ядер головного мозга. Активируя гонадолиберинергические нейроны гипоталамуса, кисспептин обеспечивает выработку гонадолиберина, который далее по механизму прямой положительной связи способствует продукции половых гормонов аденогипофизом и половыми железами [3–5]. Функционирование системы «гипоталамус–аденогипофиз–гонады» может зависеть от факторов различной этиологии. Известно, что стрессорные воздействия, развитие десинхронизации, психо-эмоциональные нарушения [6; 7] могут вызывать «сбои» в деятельности систе-

мы, ответственной за репродуктивный потенциал организма. Это определяет актуальность исследований в области физиологии репродукции.

Адекватной экспериментальной моделью при изучении особенностей протекания репродуктивных процессов в норме и патологии является эстральный цикл у самок крыс, отражающий морфологические изменения клеток слизистой влажлища в связи с циклическими гормональными преобразованиями. В исследованиях показана высокая степень аллометричности механизмов функционирования репродуктивной сферы самок крыс и женского организма. При сопоставлении пульсаций уровня гонадотропинов в течение всего цикла у женщин и эстрального цикла у крыс выявлена их идентичность. Высокая аллометричность половых сфер женщин и крыс подтверждается не только схожестью нормального функционирования гормональных механизмов контроля репродукции, формирования бесплодия, но и аналогичностью процессов инволюции половой функции [8; 9].

Цель настоящего исследования – на основании оценки клеточного состава влажлистных мазков и расчёта кальпоцитогаммических индексов проследить особенности протекания эстральных циклов у крыс, а также обобщить данные литературы о значении компонентов кисспептинергической системы в обеспечении нормального протекания репродуктивных процессов.

© Локтаева А. В., Беляков В. И., 2016.

Локтаева Анастасия Владимировна,

(vodoleys@mail.ru),

магистрант биологического факультета;

Беляков Владимир Иванович,

(vladbelakov@mail.ru),

доцент кафедры физиологии

человека и животных

Самарского университета,

443086, Россия, г. Самара, Московское шоссе, 34.

Условия и методы исследования

Методика исследования соответствовала требованиям ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)», а также Правилам лабораторной практики и директивам Европейской Конвенции по защите позвоночных животных. Протокол исследования утверждён на заседании комиссии по биоэтике Самарского университета. Эксперименты проводились в летний период на 16-ти крысах-самках линии *Wistar* в возрасте 2–3 месяцев, массой 190–220 граммов. Животные содержались в стандартных условиях вивария (режим освещения – 12:12; температура в помещении – 18–20 °С; влажность воздуха – 60–70 %). Крысы находились в клетках для мелких грызунов по 8 особей. Кормление крыс осуществлялось в свободном режиме смесью для грызунов, вода подавалась *ad libitum* при помощи автоматических поилок. В эксперимент отбирались самки, имевшие регулярный эстральный цикл продолжительностью 4–5 дней и характерную картину влагалищных мазков на каждой стадии цикла. Фазы эстрального цикла (диэструс, проэструс, эструс) определяли с использованием микроскопа «Биомед» (увеличение 200) по соотношению основных типов клеток в мазке: лейкоцитов, промежуточных эпителиальных клеток (созревающих крупных клеток округлой или овальной формы с относительно небольшим, концентрически расположенным ядром), парабазальных клеток (относительно мелких клеток с крупным ядром) и чешуек (самых крупных клеточных образований неправильной формы с различной степенью выраженности кариопикноза). Кроме того, оценивалась представленность в мазках слизи и клеточных конгломератов (относительно плотных скоплений клеток за счёт слизи). Для компьютерной визуализации изображения морфологической картины влагалищных мазков использовалась цифровая насадка на микроскоп (*Levenhuk C 510 NG 5 M USB 2.0*). Окраска мазков осуществлялась 0,5 % раствором метиленового синего.

Структура мазков исследовалась на протяжении двух недель ежедневно в утреннее время. Для построения кальцитограм-

мы в каждом мазке подсчитывалось 100 эпителиальных клеток. По соотношению различных типов клеток в мазке определялись: кариопикнотический индекс (процентное отношение числа клеток с пикнотическими ядрами к общему количеству клеток в мазке) и индекс промежуточных клеток (процентное отношение числа промежуточных клеток к общему числу клеток). Оценка морфологической картины влагалищных мазков и кальцитографических индексов позволяла косвенно судить о гормональном профиле [9].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с помощью программы SigmaStat с использованием теста *One Way ANOVA* и t-теста Стьюдента. Значения считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Численные данные в тексте приведены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Для построения графиков использовалась программа SigmaPlot.

Результаты и их обсуждение

Результаты микроскопической оценки клеточного состава влагалищных мазков свидетельствуют о том, что большинство самок крыс имели регулярные эстральные циклы с характерными изменениями в соотношениях между основными популяциями клеток. За двухнедельный период наблюдений определялось в среднем $3,1 \pm 0,2$ циклов при средней продолжительности одного цикла около 100 часов. Полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о том, что у молодых самок крыс в летний период продолжительность одного эстрального цикла составляет 4–5 дней [9]. На протяжении всего периода наблюдения определялась характерная смена морфологического состава влагалищных мазков (рис. 1). Вследствие относительно короткого времени протекания эстрального цикла и динамичного перехода одной основной стадии в другую в отдельных наблюдениях регистрировались переходные стадии цикла.

На стадии диэструса, продолжавшегося около двух суток, в мазках идентифицировалось значительное количество лейкоцитов при практически полном отсутствии эпителиальных клеток.

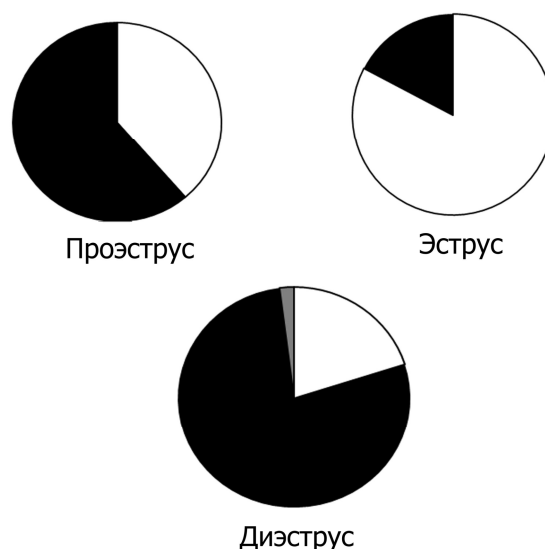


Рис. 1. Соотношение различных типов клеток влагалищного мазка в различные стадии эстрального цикла крыс

Примечание: черные сектора – промежуточные клетки, белые сектора – поверхностные клетки, серый сектор – базальные клетки.

В переходную стадию от диэструса к проэструсу наряду с лейкоцитами отмечалось появление промежуточных эпителиальных клеток с относительно мелкими ядрами. В некоторых случаях обнаруживались мелкие эпителиальные клетки округлой или овальной формы с хорошо оформленным крупным ядром. Подобная картина указывает на появление в мазках парабазальных клеток. Стадия проэструса характеризовалась увеличением в мазках числа промежуточных эпителиальных клеток крупного размера с мелкими, центрально расположенными ядрами. В некоторых мазках встречались поверхностные клетки с пикнотическими ядрами в комбинации с немногочисленными чешуйчатыми клетками. На стадии эструса обнаруживалось значительное число чешуйчатых клеток неправильной формы на фоне практически полного отсутствия лейкоцитарной группы клеток. Ключевой характеристикой цитологической картины метаэструса являлось наличие слизи и разнообразных типов клеток (чешуйчатых, эпителиальных клеток с мелким, плохо оформленным ядром, лейкоцитов). Встречались крупные конгломераты из сильно деформированных клеток с пикнотическими ядрами. Фон таких мазков оценивался как «грязный». Переход от ме-

таэструса к диэструсу определялся по появлению в мазках отдельных эпителиальных клеток с достаточно крупным ядром и возрастанию представленности лейкоцитов. При этом число чешуйчатых и поверхностных клеток с пикнотическими ядрами сокращалось, клеточные конгломераты практически не обнаруживались.

Отмеченная динамика изменений в картине влагалищных мазков подтверждается расчётными индексами (рис. 2). В частности, индекс промежуточных клеток, являющийся показателем относительно низкого уровня эстрогенов, имел максимальное значение на стадии диэструса. По мере развития эстрального цикла отмечалось закономерное уменьшение величины данного индекса, максимально проявившееся во время эструса.

Кариопикнотический индекс, являющийся маркером эстрогенной активности, напротив, имел выраженную положительную динамику в цикле «диэструс–проэструс–эструс». На стадии эструса регистрировалось увеличение данного индекса в 2 раза по сравнению со стадией покоя. Данное обстоятельство косвенно свидетельствует о должном уровне функционирования системы «гипоталамус–аденогипофиз–яичники» и нормальной продукции эстрогенов.

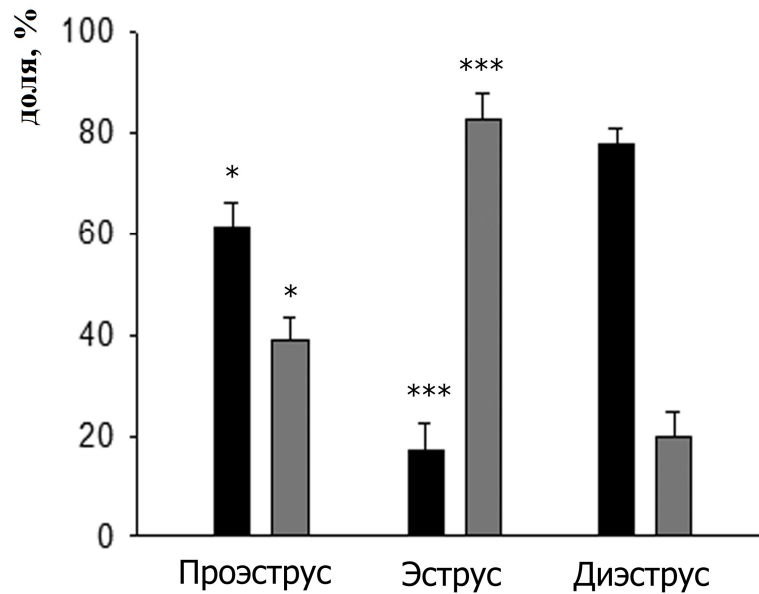


Рис. 2. Оценка индекса промежуточных клеток и кариопикнотического индекса в различные стадии эстрального цикла крыс

Примечание: черные столбики – индекс промежуточных клеток, серые столбики – кариопикнотический индекс, * – статистически значимые отличия по сравнению с диэструсом при $p < 0,05$, *** – статистически значимые отличия по сравнению с диэструсом при $p < 0,001$.

Описанные выше изменения морфологии влагалищных мазков связаны с особенностями функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадальной системы, определяющей циклический характер продукции половых гормонов. В последнее время представления о нейрогормональных механизмах контроля данной системы существенно расширились (рис. 3). Идентифицированы некоторые нейрохимические механизмы регуляции выработки гонадолиберина [10–14]. В частности, установлена особая роль в этом процессе нейроглиальных элементов, которые посредством ростовых факторов и глутамата активируют выработку данного гипоталамического фактора. Установлено тормозное влияние на продукцию гонадолиберина со стороны эндогенных опиоидных пептидов, ГАМК, динорфина; активирующее влияние – со стороны глутамата, норадреналина, тахикининов (нейрокинина В), лептина. Согласно современным представлениям ключевая роль в инициации выработки гонадолиберина с момента наступления полового созревания принадлежит киспептину [2–5; 15].

К настоящему времени достаточно обстоятельно изучены рецепторные механизмы, опосредующие клеточные эффекты киспептина (рис. 4). Рецепторы к данному нейрорепептиду принадлежат к семейству G-сопряжённых [16]. Их активация вызывает запуск сложного организованного каскада внутриклеточных процессов, обеспечивающих деполяризацию мембраны и перестройку метаболизма нейронов. Сам путь внутриклеточной передачи с GPR-54 представляется следующим образом. Сигнал с рецепторов передается на G-белок и фосфолипазу C, которая осуществляет расщепление фосфоинозитидов мембраны с образованием молекул вторичных мессенджеров – диацилглицерола и инозитол-3-фосфата. Инозитол-3-фосфат обеспечивает выход ионов кальция из внутриклеточного депо (эндоплазматического ретикулума) и последующую активацию протеинкиназы C, включенной в регуляцию различных внутриклеточных процессов. Диацилглицерол обеспечивает инактивацию K^+ -каналов, активацию Na^+ -каналов, что закономерно вызывает деполяризацию мембраны гонадолиберинергических нейронов [17; 18].

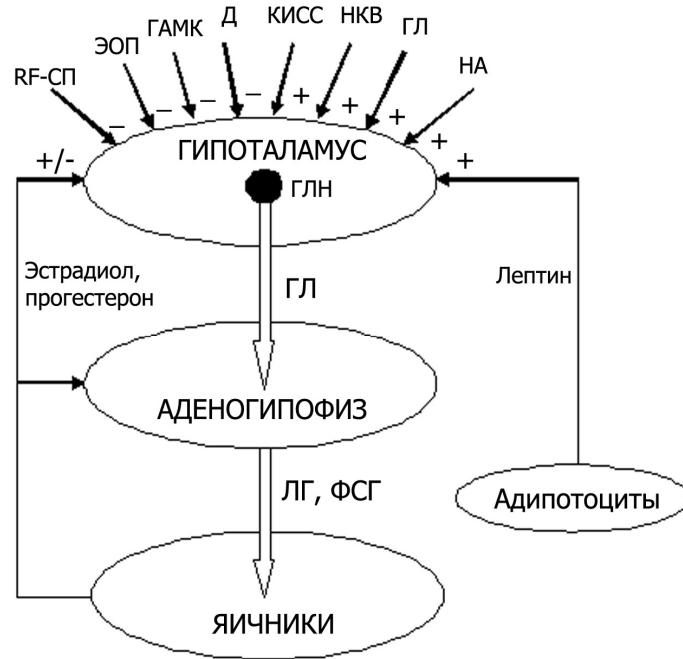


Рис. 3. Схема регуляции функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы

Примечание: RF-СП – RF-связанные пептиды, ЭОП – эндогенные опиоидные пептиды, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, Д – динорфины, КИСС – кисспептин, НКВ – нейрокинин В, ГЛ – глутамат, НА – норадреналин, ГЛН – гонадолиберинергический нейрон, ГЛ – гонадолиберин, ЛГ – лютеинизирующий гормон, ФСГ – фолликулстимулирующий гормон, «+» – активирующее влияние на выработку гонадолиберина, «-» – тормозное влияние на выработку гонадолиберина, «+/-» – активирующее/тормозное влияние на выработку гонадолиберина в зависимости от стадии цикла.

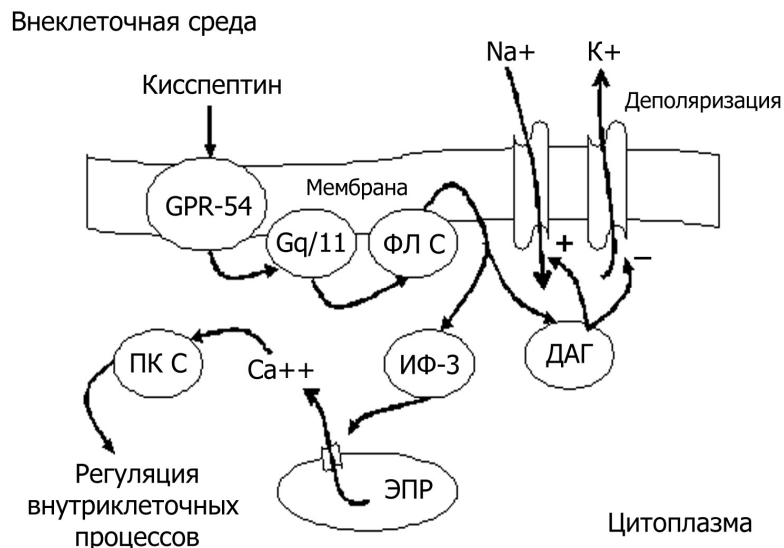


Рис. 4. Схема рецепторного механизма действия кисспептина

Примечание: GPR-54 – метаботропный рецептор к кисспептину, Gq/11 – разновидность G-белка, связанного с GPR-54, ФЛ С – фосфолипаза С, ИФ-3 – инозитол-3-фосфат, ДАГ – диацилглицерол, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, ПК С – протеинкиназа С, «+» – активирующее влияние на ионную проводимость, «-» – ингибирующее влияние на ионную проводимость.

Выработка гонадолиберина по механизму положительной прямой связи способствует образованию половых гормонов передней доли гипофиза (лютеинизирующего, фолликулстимулирующего гормонов). Последние определяют уровень функциональной активности яичников. В свою очередь периодичность продукции эстрогенов и прогестиннов, связанная с волнообразно меняющимся функциональным состоянием яичников, оказывает модулирующее влияние на половые центры гипоталамуса (обратная связь в системе «гипоталамус–аденогипофиз–яичники»). Относительно низкий уровень эстрогенов и прогестиннов стимулирует, а высокий уровень – угнетает активность половых центров гипоталамуса. Последовательное сочетание положительной и отрицательной обратной связи определяет циклическую активность центров гипоталамуса, осуществляющих контроль репродуктивной функции.

У большинства самок млекопитающих (в том числе у крыс) циклические изменения в продукции эстрогенов и прогестиннов проявляются в виде эстральных циклов с чёткой стадийной организацией. Стадия проэструса характеризуется максимальной секрецией эстрогенов созревающими фолликулами яичника и морфологически выражена в виде гипертрофии и гиперплазии эпителиальных клеток слизистой влагалища и последующим отторжением клеток, секретирующих слизь. Окончание эстрогенной стимуляции клеток влагалища происходит в стадию эструса. В это время стимулированные высоким уровнем эстрогенов эпителиальные клетки слизистой влагалища расслаиваются и формируют слой чешуек. Дальнейшее снижение концентрации эстрогенов приводит к развитию следующей стадии (метаэструсу), который сопровождается некротическими процессами и отторжением клеток базального слоя слизистой. По времени данная стадия совпадает с образованием жёлтых тел и секрецией ими прогестиннов, являющихся функциональными антагонистами эстрогенов в отношении влияния на клетки влагалищного эпителия. Стадия диэструса характеризуется пролиферативной слабостью и продукцией эпителиальными клетками слизи за счёт низкого уровня эстрогенов [9]. Функционирова-

ние механизмов, контролирующих работу гипоталамо-гипофизарно-гонадальной оси и смену стадий эстрального цикла, может изменяться в зависимости от психо-эмоционального состояния организма, действия стрессоров и других факторов.

Литература

1. Бабичев В. Н. Нейроэндокринная регуляция репродуктивной системы. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1995. 227 с.
2. Babiker A., Al Shaikh A. The role of kisspeptin signalling in control of reproduction in genetically similar species. Sudan // J. Paediatr. 2016. Vol. 16 (1). P. 9–16.
3. Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons / S. Constantin, C. S. Caligioni, S. Stojilkovic [et al.] // Endocrinology. 2009. Vol. 150. P. 1400–1412.
4. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54 / N. De Roux, E. Genin, J. C. Carel [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. Vol. 100. P. 10972–10976.
5. The GPR54 gene as a regulator of puberty / S. B. Seminara, S. Messager, E. E. Chatzidaki [et al.] // The New England Journal of Medicine. 2003. Vol. 349. P. 1614–1627.
6. Алексеев Б. Е., Белоус И. М. Сексуальные дисфункции у женщин с психогенными депрессиями // Обозрение психиатрии и медицинской психологии. 2013. № 1. С. 22–24.
7. Перехов А. Я. Депрессия и сексуальные расстройства у женщин в естественной и хирургической менопаузе // ОРЖИН. Акушерство. Гинекология. Репродукция. 2009. № 4. С. 6–9.
8. Wise P. M., Kashon M. L., Krajnak K. M. Aging of the female reproductive system: a window into brain aging // Recent Prog. Horm. Res. 1997. Vol. 52. P. 279–303.
9. Cora M. C., 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 // Toxicol. Pathol. 2015. Vol. 43 (6). P. 776–793.
10. Chen W. P., Witkin J. W., Silverman A. J. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons are directly innervated by ca-

techolamine terminals // Synapse. 1989. Vol. 3 (3). P. 288–290.

11. Horvath T. L., Naftolin F., Leranath C. Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas // J. Neuroendocrinol. 1993. Vol. 5 (1). P. 71–79.

12. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation luteinizing hormone and prolactin / C. Kordon, S. V. Drouva, G. M. de la Escalera [et al.] // The physiology of reproduction. NY.: Raven Press Ltd, 1994. P. 1621–1681.

13. Herbison A. E. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion // Rev. Reprod. 1997. Vol. 2 (1). P. 1–6.

14. Роль биогенных аминов в гипоталамической регуляции репродуктивной функции / А. В. Арутюнян, Г. О. Керкешко, М. Г. Степанов [и др.] // Журнал акушерства

и женских болезней. 2004. Вып. LIII (1). С. 98–106.

15. Зарубина Е. Г., Лысова А. Н., Беляков В. И. Влияние kiss-пептина на эстральный цикл крыс // Морфологические ведомости. 2014. № 2. С. 34–40.

16. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor // Nature. 2001. Vol. 411. P. 613–617.

17. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor / L. J. Stafford, C. Xia, W. Ma [et al.] // Cancer Research. 2002. Vol. 62. P. 5399–5404.

18. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge / J. Clarkson, X. d'Anglemont de Tassigny, A. S. Moreno [et al.] // J. Neurosci. 2008. Vol. 28 (35). P. 8691–8697.

FEATURE ESTROUS CYCLE IN RATS AND VALUE KISSPEPTINERGIC SYSTEM IN ITS REGULATION

A. V. Loktaeva, V. I. Belyakov

In the model experiment on adult female rats were studied features of the estrous cycle, analyzed cytological picture of vaginal smears in the individual stages of the cycle (proestrus, estrus, diestrus). Marked change in the various indices kalpotsitogrammy at stages of the estrous cycle. The paper summarizes information about the significance of the components kisspeptinergic system to ensure the functioning of the hormonal axis «hypothalamus-anterior pituitary-ovarian».

Key words: estrous cycle, estrus, proestrus, diestrus, kisspeptin.

Статья поступила в редакцию 15.11.2016 г.

© Loktaeva A. V., Belyakov V. I., 2016.
Loktaeva Anastasiya Vladimirovna,
(vodoleys@mail.ru),
graduate student of the biological faculty;
Belyakov Vladimir Ivanovich,
(vladbelakov@mail.ru),
assistant professor of the Human
and Animal Physiology Department
of the Samara University,
443086, Russia, Samara, Moskovskoye Shosse, 34.