

© Каргалова Е.П., Коцюба А.Е., Черток В.М., Момот Л.Н., Храмова И.А., 2019

УДК 6111.651.08:611.16.08:615.357

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.1.41-45

Влияние эстрадиола на временную организацию микроциркуляторного русла яичников крыс

Е.П. Каргалова, А.Е. Коцюба, В.М. Черток, Л.Н. Момот, И.А. Храмова

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Цель исследования: изучение динамики структурной организации микроциркуляторного русла яичников крыс в разное время суток и при воздействии эстрадиола. **Материал и методы.** Работа выполнена на яичниках двух групп половозрелых самок-крыс линии Вистар: контрольной ($n=24$), животных которой исследовали в 2, 6, 10, 14, 18, 22 часа, и экспериментальной ($n=20$) – после введения масляного раствора эстрадиола дипропионата в ночное (2 и 6 часов) и дневное (14 и 18 часов) время. Вычисляли активность щелочной фосфатазы и НАДФ-диафоразы (НАДФ-д) в стенке сосудов, суммарную длину энзимопозитивных сосудов в корковом веществе яичников, относительную плотность тучных клеток. **Результаты исследования.** В ночные и утренние часы в корковом веществе яичников капилляры отличаются интенсивной реакцией на щелочную фосфатазу и НАДФ-д, а плотность расположения таких сосудов относительно высока. В дневные и вечерние часы энзимопозитивные сосуды встречаются реже, и среди них преобладают капилляры с низкой или умеренной активностью ферментов. Помимо капилляров, на срезах, окрашенных на НАДФ-д, в межфолликулярных зонах и строме яичников выявляются тучные клетки. Введение эстрадиола вызывает повышение активности щелочной фосфатазы и НАДФ-д в стенке капилляров, увеличение плотности перифолликулярной сосудистой сети и тучных клеток. При этом значения активности ферментов и число тучных клеток увеличиваются на 8–12% больше, чем суммарная длина микроциркуляторного русла. **Обсуждение полученных данных.** Введение эстрадиола сопровождается перестройкой структуры сосудистого сплетения коркового вещества яичника с повышением активности щелочной фосфатазы и НАДФ-д в стенке микрососудов, увеличением плотности энзимопозитивной капиллярной сети и числа тучных клеток, среди которых нередко встречаются дегранулированные формы. Изменения структурных элементов яичника выражены в большей степени при введении эстрадиола в дневные часы.

Ключевые слова: капилляры, тучные клетки, щелочная фосфатаза, НАДФ-диафораза

Яичники обладают хорошо развитой системой циркуляции крови, чутко реагирующей на экзогенные воздействия, что широко используется в клинической практике для коррекции нарушенных функций этого органа [1, 9, 13]. Высокая пластичность микроциркуляторного русла (МЦР) яичников находит отражение в изменениях его основных гистохимических параметров: активности транспортных ферментов и суммарной длины энзимопозитивных сосудов [2, 6]. Величина этих параметров в женских репродуктивных органах связана с концентрацией стероидных гормонов, которые инициируют возрастные и сезонные преобразования кровеносной системы яичников и матки, ее перестройки в течение полового цикла и при беременности [4, 5, 10, 12]. Известно, что содержание эстрогенов значительно варьирует в течение суток [10], и потому можно ожидать соответствующих преобразований капиллярной сети яичника.

Цель исследования состояла в изучении динамики структурной организации МЦР яичников крыс в разное время суток и при воздействии эстрадиола.

Материал и методы

Исследование выполнено на 44 половозрелых самках крыс линии Вистар, массой 200–240 г в фазу проэструса, содержащихся на стандартном рационе в условиях лабораторного вивария. Экспериментальные манипуляции проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию,

Черток Виктор Михайлович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека ТГМУ; e-mail: chertokv@mail.ru

кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Крыс анестезировали внутрибрюшинным введением рометара (Xylazinum, Spora, Прага) в концентрации 5,5 мг/кг, после чего декапитировали.

Кровеносные сосуды коркового вещества яичников у 24 контрольных животных изучались через 30 мин. после внутримышечной инъекции 0,3 мл стерильного оливкового масла в 2, 6, 10, 14, 18 и 22 часа после начала исследования. В экспериментальной группе из 20 крыс сосуды яичников изучили через 30 мин. после введения масляного раствора эстрадиола дипропионата (5 мкг/кг) в ночное (2 и 6 часов) и дневное (14 и 18 часов) время. МЦР выявляли на криостатных срезах толщиной 25–30 мкм гистохимической реакцией на щелочную фосфатазу и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафору (НАДФ-д). Алгоритм и методика обнаружения микрососудов данными методами подробно описаны нами ранее [6, 7]. Препараты просматривали под микроскопом AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

Определены суммарная длина (плотность) энзимопозитивных капилляров и количество тучных клеток (из расчета на 1 мм^2) в пяти неперекрывающихся полях зрения микроскопа (объектив $40\times$), а также активность фермента (интенсивность реакции) в стенке этих сосудов. Количественную обработку провели не менее чем на пяти срезах каждого образца с использованием пакета программ автоматизированной системы анализа изображений ImageScore (Leica, Германия). Данные количественного анализа представили в виде среднего

значения и стандартной ошибки среднего, полученных при обработке образцов от каждого животного. Для оценки значимости цифровых данных применили t-критерий Стьюдента. Значения доверительного интервала, $p \leq 0,05$, считали статистически достоверными.

Результаты исследования

Структурная организация МЦР в яичниках контрольной группы крыс в течение суток закономерно меняется. В ночные и утренние часы в корковом веществе яичников часто определяются капилляры с интенсивной реакцией щелочной фосфатазы и НАДФ-д, а плотность расположения таких сосудов относительно высока. В дневные и вечерние часы энзимопозитивные сосуды встречаются реже, и среди них преобладают капилляры с низкой или умеренной активностью ферментов (рис. 1, а–г). Помимо капилляров, на срезах, окрашенных НАДФ-д, в межфолликулярных зонах и строме органов определяются тучные клетки. Они чаще наблюдаются в дневные часы, образуя небольшие скопления из 3–5 единиц между фолликулами или по ходу артерий (рис. 1, в, г).

Отмеченные преобразования гистохимических признаков капилляров в течение суток подтверждаются морфометрическими показателями (рис. 2, а, б). В большей степени меняется активность ферментов, максимальные значения которой в стенке сосудов устанавливаются между 2–6, минимальные – между 14–18 часами (рис. 2, а). При этом колебания активности щелочной фосфатазы в ночные и утренние часы составляют 12–18%, НАДФ-д – 18–26% ($p < 0,05$), а в дневное время, соответственно, – 12–14 и 8–10% ($p < 0,05$).

Внутрисуточные преобразования плотности перифолликулярных сосудистых сетей имеют сходную тенденцию, однако, по сравнению с активностью энзимов, суммарная длина МЦР меняется не столь существенно (рис. 2, б). Размах колебаний данного показателя среди капилляров, маркированных щелочной фосфатазой, в ночные и утренние часы составляет 6–8%, НАДФ-д – 8–12%, в дневное время не превышает 4–10%. Тучные клетки в ночные часы регистрируются почти вдвое чаще, чем в дневные (рис. 2, б). Наибольшее их количество определяется в 6, минимальное – в 18 часов. В 2 и 6 часов большинство клеток находится в состоянии дегрануляции,

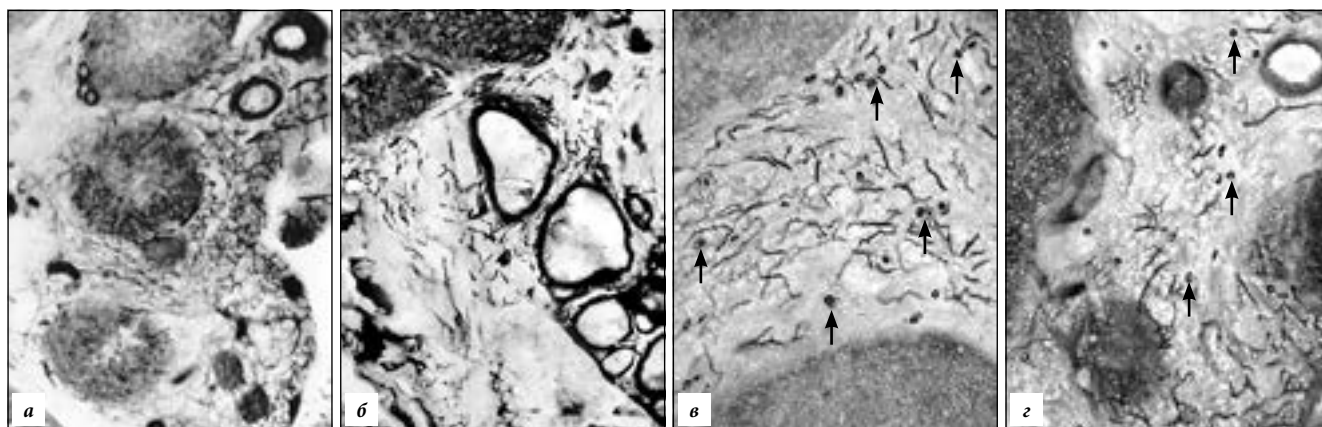


Рис. 1. Микроциркуляторное русло яичника крыс контрольной группы:

а, в – в 6 часов, б, г – в 18 часов; а, б – реакция на щелочную фосфатазу, в, г – реакция на НАДФ-д (стрелками отмечены тучные клетки). $\times 200$.

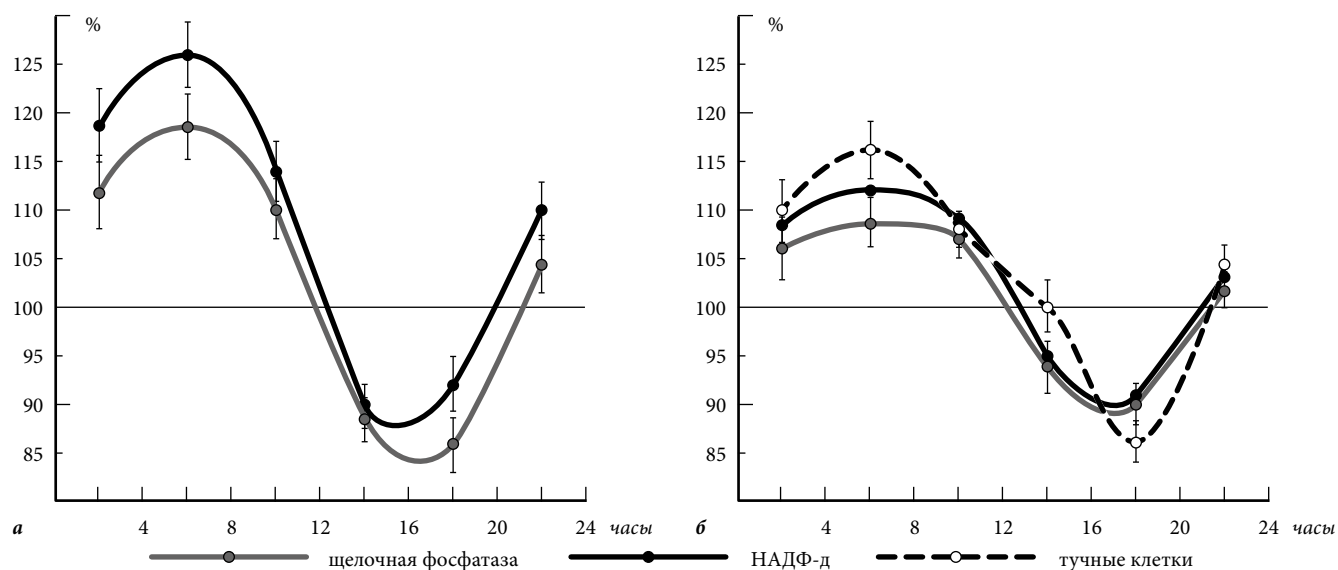


Рис. 2. Внутрисуточные колебания активности щелочной фосфатазы и НАДФ-д (а) и относительной плотности капилляров и тучных клеток (б) в яичниках крыс (за 100% принята величина соответствующего показателя в 12:00).

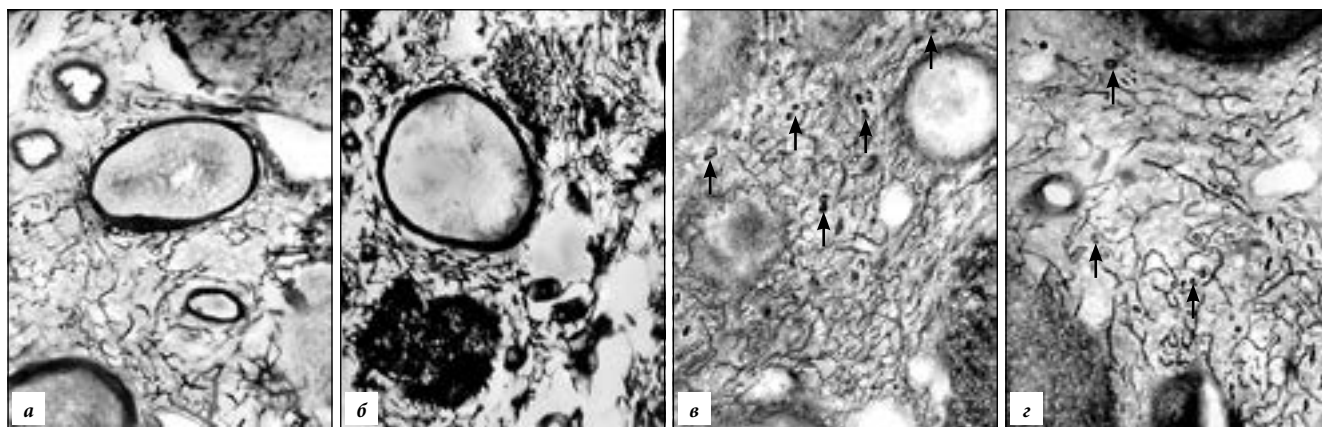


Рис. 3. Организация микроциркуляторного русла яичника крыс после введения эстрадиола:

а, б – реакция на щелочную фосфатазу, в, г – реакция на НАДФ-д; а, в – в 6 часов, б, г – в 18 часов (стрелками отмечены тучные клетки). ×200.

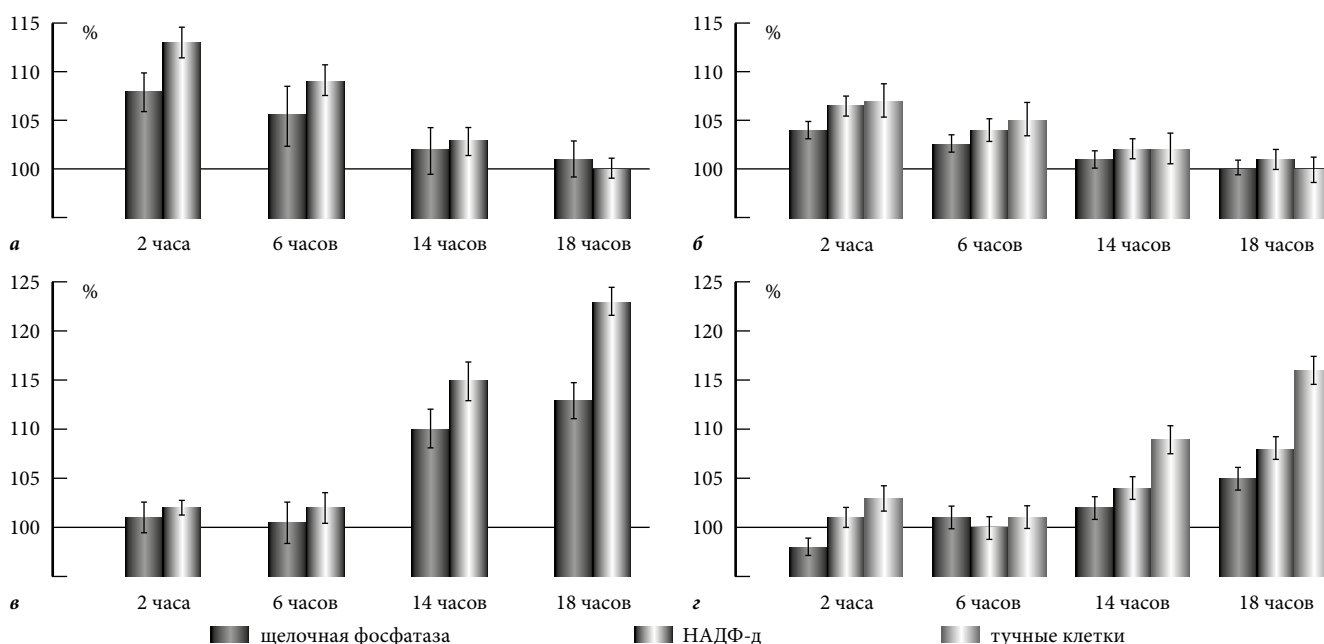


Рис. 4. Внутрисуточные колебания активности щелочной фосфатазы и НАДФ-д в яичниках крыс экспериментальной группы: а, в – щелочная фосфатаза и НАДФ-д, б, г – относительная плотность капилляров и тучных клеток; а, б – введение эстрадиола в ночное время, в, г – введение эстрадиола в дневное время (за 100 % принята величина соответствующего показателя у контрольных животных).

в дневные часы активно секретирующие формы тучных клеток встречаются очень редко.

Введение эстрадиола вызывает перестройку сосудистого сплетения коркового вещества яичника, сопровождающуюся повышением активности щелочной фосфатазы и НАДФ-д в стенке капилляров, увеличением плотности перифолликулярной капиллярной сети и количества тучных клеток, среди которых нередко встречаются дегранулированные формы (рис. 3).

Подсчеты показывают, что реакция МЦР и тучных клеток зависит от времени использования препарата (рис. 4). При ночном введении эстрадиола активность щелочной фосфатазы в стенке капилляров значимо больше контрольного уровня: в 2 часа – на 7,9 %, в 6 часов – на 6,6 %. Отклонения соответствующих показателей активности НАДФ-д становятся в среднем на 3–5 % выше, чем щелочной фосфатазы (рис. 4, а). Суммарная длина МЦР, маркированного щелочной фосфатазой и НАДФ-д, при введении эстрадиола в 2 часа меняется

более существенно, чем в 6 часов (рис. 4, б), но в том и другом случае остается на 4–6 % ниже соответствующих показателей активности ферментов ($p < 0,05$). Введение эстрадиола также приводит к повышению количества тучных клеток по сравнению с контролем, причем в 2 часа более существенно, чем в 6 часов (рис. 4, б). Однако в 6 часов большинство этих клеток находится в состоянии дегрануляции, тогда как в 2 часа такие клетки немногочисленны.

В дневное время (14:00 и 18:00), когда у контрольных животных наблюдается относительно низкий уровень активности ферментов, введение эстрадиола вызывает более выраженное увеличение исследованных параметров, чем в ночное (рис. 4, а, в). Особенно значительный прирост наблюдается в 18 часов среди структур, маркированных НАДФ-д. При этом значения активности ферментов и числа тучных клеток увеличиваются на 8–12 % больше, чем суммарная длина путей микроциркуляции ($p < 0,05$).

Обсуждение полученных данных

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о временной зависимости структурной организации МЦР и тучных клеток коркового вещества яичников, что, вероятно, связано с суточным ритмом секреции эстрогенов, максимум которой у крыс приходится на ночные часы [10]. В данный временной интервал в сосудах прослеживается значительное увеличение активности НАДФ-д, служащей маркером одного из основных ферментов синтеза оксида азота – NO-синтазы [5, 11, 13] и щелочной фосфатазы, которая в яичниках и матке характеризует, в том числе, транспортные свойства капилляров [4, 6, 7]. Одновременно возрастает плотность капилляров и НАДФ-д-позитивных тучных клеток. В дневные часы в отношении исследуемых структур наблюдается обратный эффект. Размах внутрисуточных колебаний среди капилляров, маркированных НАДФ-д, выраженнее, чем среди сосудов, выявленных щелочной фосфатазой.

В последние годы появляется все больше фактов, позволяющих считать капилляр относительно «самостоятельной фигурой», способной собственными механизмами обеспечить регуляцию одной из наиболее важных своих функций – избирательного обмена [4]. Представленные выше материалы указывают на временную зависимость данной функции, что необходимо учитывать в клинической практике для повышения эффективности лекарственной терапии.

Транспортные свойства эндотелия капилляров, безусловно, имеют решающее значение для трофики органов, хотя думать, что регуляторный потенциал эндотелиоцитов направлен лишь на обеспечение проницаемости сосудов, было бы неверно. Как показывают наши данные, эндотелий капилляров представляет собой физиологически активный, динамичный и пластичный барьер, который позволяет изменять интенсивность транскапиллярного транспорта в соответствии с временными особенностями функционирования яичника. Сигнальной молекулой в этом случае может выступать оксид азота, который оказывает непосредственное влияние на перемещение молекул через стенку капилляра [5, 15]. При его блокаде происходит компенсаторное увеличение транспорта воды и газов через межэндотелиальные контакты за счет торможения ингибирующего воздействия кавеолина на NO-синтазу, которая ассоциирована с ним в плазматической мембране эндотелиоцитов [11, 13]. Под влиянием гистамина, серотонина и других рецепторзависимых стимулов, которые освобождаются при дегрануляции тучных клеток, может проходить вытеснение энзима из комплекса «кавеолин–NO-синтаза» и увеличение концентрации кальция в эндотелиоцитах. В результате, происходит высвобождение NO-синтазы из плазматической мембраны, ее активация кальций-кальмодулином, окисление L-аргинина и увеличение синтеза оксида азота, обладающего вазодилаторным действием. Сигналы завершаются при снижении концентрации газотрансмиттера, вследствие уменьшения его продукции.

Важная роль тучных клеток яичника в данном процессе отмечена в нескольких исследованиях [7, 14]. Но, насколько нам известно, впервые представлены факты их возможного участия во временной организации МЦР яичников. Вместе с тем имеются материалы о влиянии тучных клеток на управление биоритмами других органов [3]. Кроме того, оксид азота в сосудах яичников и матки опосредует действие рецепторов эстрадиола и прогестерона [9, 12, 15], а также играет заметную роль в ангиогенезе, влияя на экспрессию сосудисто-эндотелиального фактора роста и тем самым регулируя проницаемость растущих капилляров [8]. Оксид азота может воздействовать на транспортные ферменты. Экспериментально доказано, что в малых дозах донор оксида азота L-аргинин вызывает достоверное изменение активности фосфатаз [5, 7]. Поскольку реакция проходит быстро и не зависит от присутствия ионов кальция, усиление синтеза оксида азота в данном случае, скорее всего, происходит за счет экспрессии индуцибельной NO-синтазы.

Исследования внутрисуточной динамики ферментов, участвующих в трансэндотелиальном перемещении молекул в капиллярах яичника при изменении гормонального статуса организма, крайне ограничены, в связи с чем мы изучили влияние наиболее активного эстрогена – эстрадиола – на временную организацию некоторых гистохимических параметров МЦР этого органа. Введение эстрадиола сопровождается перестройкой структуры сосудистого сплетения коркового вещества яичника с повышением активности щелочной фосфатазы и НАДФ-д в стенке капилляров, увеличением плотности энзимопозитивной капиллярной сети и количества тучных клеток, среди которых нередко встречаются дегранулированные формы. Изменения структурных элементов яичника выражены в большей степени при введении эстрадиола в дневные часы.

Интраорганные кровеносные сосуды женских репродуктивных органов часто рассматриваются в качестве мишени для действия половых гормонов [10, 11]. В стенке артерий яичника и матки идентифицированы рецепторы эстрадиола α и β , одновременно служащие транскрипционными факторами, через которые опосредуется гормональный эффект [12, 13]. Реакция этих двух подтипов рецепторов зависит от лиганда, поэтому они могут играть неодинаковую роль в регуляции генов. Эстрогены связываются с рецепторами, ассоциированными с ядром и плазматическими мембранами клеток, митохондриями и лизосом. Происходит усиленное образование микровезикул, увеличивается отток кальция, ускоряется транспорт глюкозы и аминокислот, высвобождаются некоторые лизосомные ферменты, а также гистамин и серотонин из лежащих периваскулярно тучных клеток [7, 14]. Совсем недавно в сосудах яичника и матки доказано существование еще одного типа рецептора эстрогена – GPER (G protein-coupled estrogen receptor), ассоциированного с G-белком, вазодилаторный эффект которого связан с выработкой оксида азота эндотелием сосудов женских репродуктивных органов [9, 15]. Вполне вероятно,

что эстрогены изменяют основные параметры кровотока, оказывая влияние на рецепторы гладких миоцитов прекапиллярных сфинктеров через NO-cGMP сигнальный путь [15]. Воздействуя на липидный состав плазматических мембран клеток-мишеней, эстрогены модифицируют рецепторно-сигнальные системы и изменяют жидкокристаллическое состояние мембраны, в которую встроены транспортные ферменты, приводя к их конформационным превращениям.

Выполненное исследование показало, что организация МЦР яичников во многом зависит от времени использования эстрадиола, что необходимо учитывать при гормонотерапии. Выраженность отмеченных изменений тесно связана с исходной величиной гистохимических параметров МЦР: в дневное время при низком уровне эстрадиол вызывает их увеличение, при высоком – сокращение. Заметим, что полученные результаты согласуются с так называемым «правилом исходного уровня Вальдеера», по которому раздражители физиологического диапазона при исходном значении показателя, соответствующего нижней границе нормы, вызывают его повышение до средних величин, а при уровне, близком к верхней границе нормы, – снижение.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Гинекология. Национальное руководство / под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова [и др.]. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 1008 с.
2. Kargalova E.P., Momot L.N., Voiskaya N.V. Morphological features of ovarian microvessels under the influence of exogenous steroids // *J. Anat. Histol.* 2015. Vol. 4, No. 3. P. 56.
3. Laryushkina A.V., Chertok V.M. Biological rhythms of tissue basophils in various sites of rat dura mater // *Bull. Experim. Biol. Med.* 2000. Vol. 129, No. 1. С. 83–85.
4. Храмова И.А., Черток В.М., Коцюба А.Е., Черток А.Г. Структурная организация кровеносной системы матки // *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2018. № 3. С. 13–23.
5. Chertok V.M., Zenkina V.G. Regulation of ovarian function: Part of the gas transmitters NO, CO and H₂S // *Uspehi Fiziologicheskikh Nauk.* 2015. Vol. 46, No. 4. P. 74–89.
6. Черток В.М., Зенкина В.Г., Каргалова Е.П. Функциональная морфология яичника. Владивосток: Медицина ДВ, 2015. 154 с.
7. Chertok V.M., Nemkov Yu.K., Chertok A.G. Intraorgan blood vessels of the uterus. Vladivostok: Medicina DV, 2018. 208 p.
8. Черток В.М., Черток А.Г., Зенкина В.Г. Эндотелиозависимая регуляция ангиогенеза // *Цитология.* 2017. Т. 59, № 4. С. 243–258.
9. Chertok V.M., Chertok A.G., Zenkina V.G. Endotelial-dependent of the regulation of angiogenesis // *Tsyitologiya.* 2017. Vol. 59, No. 4. P. 243–258.
10. Fredette N.C., Meyer M.R., Prossnitz E.R. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2018. Vol. 176. P. 65–72.
11. Krejza J., Mariak Z., Nowacka A. [et al.]. Influence of 17-beta-estradiol on cerebrovascular impedance during menstrual cycle in women // *J. Neurol. Sci.* 2004. Vol. 221. P. 61–67.
12. Lapointe J., Roy M., St-Pierre I. [et al.]. Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases in the oviducts // *Endocrinology.* 2006. Vol. 147, No 12. P. 5600–5610.
13. Pastore M.B., Jobe S.O., Ramadoss J. [et al.]. Estrogen receptor- α and estrogen receptor- β in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow // *Semin. Reprod. Med.* 2012. Vol. 30, No 1. P. 46–61.
14. Tamanini C., Basini G., Grasselli F., Tirelli M. Nitric oxide and the ovary // *J. Endocrinol.* 2008. Vol. 199. P. 307–316.
15. Theoharides T.C., Stewart J.M. Genitourinary mast cells and survival // *Trans. Androl. Urol.* 2015. Vol. 4, No. 5. P. 579–586.
16. Tropea T., De Francesco E.M., Rigracciolo D. [et al.]. Pregnancy augments G protein estrogen receptor (GPER) induced vasodilation in rat uterine arteries via the nitric oxide - cGMP Signaling Pathway // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, No. 11. P. e0141997.

Поступила в редакцию 21.11.2018.

THE EFFECT OF ESTRADIOL ON THE TEMPORARY ORGANIZATION OF THE RAT OVARIAN MICROVASCULATURE

E.P. Kargalova, A.E. Kotsyuba, V.M. Chertok, L.N. Momot, I.A. Khranova Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective: The dynamics of the structural organization of the rat ovarian microvasculature was studied at different times of a day with estradiol impact.

Methods: The work was performed on the ovaries of two groups of mature Wistar female rats: control (n=24), whose animals were examined at 2, 6, 10, 14, 18, 22 hours, and experimental (n=20) – after administration of an oily estradiol solution dipropionate at night (2 and 6 hours) and day (14 and 18 hours) time. The alkaline phosphatase and NADPH-diaphorase activity in the vessel wall, the total length of enzyme-positive vessels in the ovarian cortex, and the relative density of mast cells were calculated.

Results: In the night and morning hours, the capillaries in the cortical substance of the ovaries were characterized by an intense reaction to alkaline phosphatase and NADPH-diaphorase, and the density of such vessels was relatively high. In the daytime and evening hours, enzyme-positive vessels were less common, and capillaries with low or moderate enzyme activity prevailed among them. In addition to capillaries, on sections stained for NADPH-diaphorase, mast cells were detected in the interfollicular zones and stroma of the ovaries. The administration of estradiol caused an increase in the activity of alkaline phosphatase and NADPH-diaphorase in the capillary wall, an increase in the density of the perifollicular vascular network and mast cells. The values of enzyme activity and the number of mast cells increased by 8–12%, more than the total length of the microvasculature.

Conclusions: The administration of estradiol is accompanied by a restructuring of the vascular plexus of the ovarian cortex with an increase in the activity of alkaline phosphatase and NADPH-diaphorase in the wall of microvessels, an increase in the density of the enzyme-positive capillary network and the number of mast cells, among which degranulated forms are often occur. Changes in the structural elements of the ovary are more pronounced with the administration of estradiol in the daytime.

Keywords: capillaries, mast cells, alkaline phosphatase, NADPH-diaphorase

Pacific Medical Journal, 2019, No. 1, p. 41–45.