Изучение эффективности гонадотропных индукторов овуляции у крыс с гиперандрогенией в условиях применения флутамида

Д.м.н., член-корр. НАН и НАМН Украины А.Г. РЕЗНИКОВ, д.б.н. Н.Д. НОСЕНКО, к.м.н. Е.Н. БОРИС[1], Л.И. ПОЛЯКОВА, к.б.н. П.В. СИНИЦЫН, к.б.н. Л.В. ТАРАСЕНКО

Evaluation of the efficacy of gonadotrophic inductors of ovulation in rats with hyperandrogenemia given flutamide

A.G. REZNIKOV, N.D. NOSENKO, E.N. BORIS, L.I. POLYAKOVA, P.V. SINITSYN, L.V. TARASENKO

ГУ Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины; [1]ГУ Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика МЗ Украины, Киев

Исследовано влияние антиандрогена флутамида (флутафарм, 1 мг/кг), препаратов фолликулостимулирующего гормона (менопур, 0,01 МЕ) и хорионического гонадотропина (хорагон, 5 МЕ) при их раздельном и последовательном применении на морфофункциональное состояние яичников у половозрелых самок крыс с имплантированными полимерными капсулами, содержавшими тестостерон. Наличие гиперандрогении подтверждено пятикратным возрастанием концентрации тестостерона в плазме. Анализ эстральных циклов, массы и гистологического строения яичников свидетельствовал о нарушении фолликулогенеза, дегенеративных изменениях в фолликулярном эпителии, развитии поликистоза и ановуляторного состояния у животных с гиперандрогенией. В избранных дозах флутамид или гонадотропины не нормализовали генеративную функцию яичников. Вместе с тем гонадотропная стимуляция после введения флутамида восстанавливала фолликулогенез, овуляцию и образование желтых тел. Результаты исследования указывают на возможность применения флутамида для повышения стимулирующего эффекта гонадотропинов на яичники при гиперандрогенных состояниях.

Ключевые слова: андрогены, антиандрогены, гонадотропины, поликистоз яичников, овуляция.

The objective of the present work was to study the influence of antiandrogen flutamide (flutapharm) at a dose of 1.0 mg/kg b.w., human chorionic gonadotropin (choragon, 5 IU), and folliculostimulating hormone (menopur, 0.01 IU) on the morphofunctional characteristics of ovaries. These products were administered either alone or sequentially to sexually mature female rats after the implantation of testosterone-containing polymeric capsules. The presence of hyperandogenism was confirmed by the five-fold rise in the blood testosterone levels. Analysis of the oestrus cycle, the weight and histological structure of the ovaries gave evidence of disturbed folliculogensis, degenerative changes in follicular epithelium, the development of ovarian polycystosis and anovulatory state in the hyperandrogenic animals. It is concluded neither flutamide nor gonadotrophic hormones administered at the above doses promoted normalization of the generative function of rat ovaries. At the same time, stimulation with gonadotropins following glutamide administration restored folliculogenesis, ovulation, an formation of luteal bodies. The results of this study indicate that flutamide can be used to enhance the stimulating action of gonadotropic hormones on the ovaries in hyperandrogenic individuals.

Key words: androgens, antiandrogens, gonadotropins, ovarian polycystosis, ovulation.

Гиперандрогения признана одним из ведущих факторов патогенеза синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) и другой патологии, сопровождающейся нарушением фертильности [1]. В протоколах вспомогательных репродуктивных технологий для индукции овуляции у бесплодных женщин применяют препараты гонадотропных гормонов с фолликулостимулирующей и лютеинизирующей активностью [2—4]. Вместе с тем функциональная гиперандрогения создает неблагоприятный гормональный фон для проведения индукции овуляции.

Ранее мы продемонстрировали возможность использования нестероидного антиандрогена флутамида для преодоления андрогенной блокады гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы и восстановления эстральных циклов у крыс с экспериментальной гиперандрогенной ановуляцией [5]. Клинические испытания таблеток флутафарма (ВАТ «Фармак», Украина), содержащих флутамид, показали появление спонтанных менструаций у женщин с СПКЯ и аменореей [6, 7]. Мы предположили, что с помощью флутамида можно усилить стимулирующее влияние экзогенных гонадотропинов на яичники с целью индукции овуляции в условиях повышенного уровня андрогенов в крови.

Цель работы состояла в изучении эффективности низкодозового комбинированного применения флутамида и препаратов гонадотропных гормонов для индукции овуляции у крыс с экспериментальной гиперандрогенией и поликистозом яичников.

Материал и методы

Исследования проведены на 39 самках крыс Вистар с массой тела 185—230 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения

© Коллектив авторов, 2011

e-mail: reznikov39@gmail.com

доступа к воде и пище. Эксперименты выполнены с соблюдением правил биоэтики согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Гиперандрогенное состояние (ГА) моделировали описанным ранее методом [8] путем подкожной имплантации силастиковых капсул, содержащих 5 мг кристаллического тестостерона («Fluka», Швейцария). Капсулы имплантировали 27 самкам с регулярными эстральными циклами (по результатам микроскопического анализа вагинальных мазков) под легким эфирным наркозом. Через 3 нед после операции исследовали вагинальные мазки.

Экспериментальные группы формировали из животных, находящихся в состоянии персистентного диэструса не менее 8—10 дней: 1-я группа (n=6) — самки с ГА в стадии персистентного диэструса; 2-я группа (n=8) — самки с ГА, которым через металлический зонд в желудок ежедневно в течение 10 дней вводили флутамид в виде суспензии таблетированной массы флутафарма в геле Дорфмана (0,5% гель карбоксиметилцеллюлозы в 0,9% растворе натрия хлорида с добавлением твина-80 и бензилового спирта) при дозе действующего вещества 1 мг/кг (0,2 мл суспензии на 100 г массы тела); 3-я группа (n=6) — самки с ГА, которым в течение 3 дней проводили внутримышечные инъекции менопура («Ferring», Германия) — уринарного гонадотропного препарата (ФСГ и ЛГ в соотношении 1:1) в суточной дозе 0,01 МЕ на крысу с последующим (через 24 ч) введением ударной дозы (5 МЕ на крысу, внутримышечно) хорагона («Ferring», Германия) — уринарного препарата ХГЧ; 4-я группа (n=7) — самки с ГА, которые последовательно получали флутамид (10 дней) и гонадотропины в указанных выше дозах по той же схеме. Микроскопию вагинальных мазков проводили на протяжении всего курса введения флутамида и препаратов гонадотропных гормонов, а также после его окончания в течение 4—5 дней, что соответствует продолжительности одного эстрального цикла. В случае наступления овуляции животных декапитировали в стадии эструса. Контрольную группу (n=12) составили ложнооперированные крысы, получавшие гель Дорфмана или растворитель препаратов гонадотропных гормонов.

Эвтаназию животных проводили под легким эфирным наркозом. Яичники взвешивали, фиксировали в растворе Буэна и заливали в парафин для приготовления гистологических препаратов. Срезы толщиной 5—6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и изучали с помощью световой микроскопии. На серийных срезах подсчитывали количество постовуляторных желтых тел. Содержание тестостерона в плазме определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов RIA Testosterone direct («Immunotech», Франция).

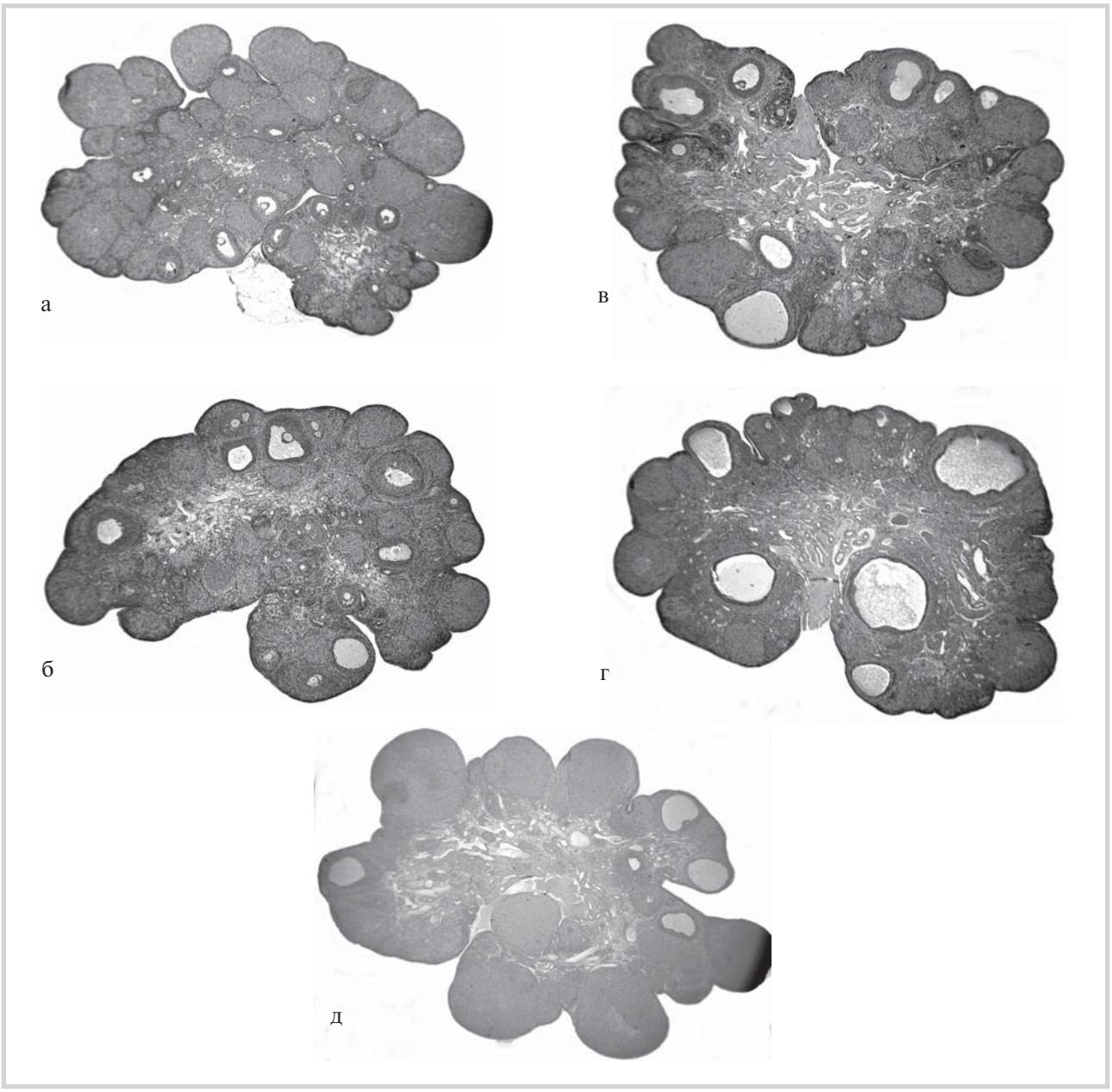
Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Гиперандрогенное состояние у подопытных самок подтверждено пятикратным возрастанием концентрации тестостерона в плазме крови (1,27±0,10 нмоль/л при норме 0,25±0,02 нмоль/л, $p<0,05$). Содержание тестостерона у самок с ГА после применения флутамида (1,09±0,14 нмоль/л) или менопура с хорагоном (1,40±0,21 нмоль/л) существенно не изменялось. Введение препаратов гонадотропных гормонов животным с ГА, которые предварительно получали в течение 10 дней антиандрогенную терапию, приводило к снижению уровня циркулирующего тестостерона (0,87±0,07 нмоль/л) по сравнению с группой самок с ГА ($p<0,05$). Такие изменения, вполне вероятно, обусловлены интенсификацией утилизации тестостерона путем ароматизации в эстрогены, поскольку известно, что активность ароматазы в клетках гранулезы яичника индуцируется ФСГ [9]. Вместе с тем ни одно из применяемых воздействий не нормализовало в полной мере содержание тестостерона, которое в 3,5—4 раза превышало средние значения нормы ($p<0,05$).

Через 3 нед после имплантации капсул с тестостероном у 90% животных нарушалась половая цикличность. У большинства самок (64,3%) развился персистентный диэструс, свидетельствующий об ановуляторном состоянии; у четверти животных отмечены нерегулярные циклы с продолжительной стадией покоя (метаэструс в совокупности с диэструсом). У андрогенизированных самок с персистентным диэструсом масса яичников уменьшилась до 15,1±1,3 мг/100 г массы тела, т.е. втрое по сравнению с контролем (46,0±2,4 мг/100 г, $p<0,001$). Характерными морфологическими проявлениями ановуляции были отсутствие желтых тел в яичниках, нарушение фолликулогенеза, кистозные изменения, атрезия фолликулов и дегенеративные изменения фолликулярного эпителия (см. рисунок, б).

В группе животных с ГА, получавших флутамид из расчета 1 мг/кг, цитологическая картина вагинальных мазков свидетельствовала о прерывании персистентного диэструса через 2—6 сут с начала введения антиандрогена, но все эти самки имели нерегулярные эстральные циклы с нарушенной фазовой структурой. Масса яичников возрастала (24,3±1,9 мг/100 г) по сравнению с андрогенизированными самками, но была почти вдвое меньше, чем у контрольных животных ($p<0,001$). У части андрогенизированных самок введение флутамида обеспечивало сохранение фолликулярного эпителия в антральных фолликулах, достаточное для об-



Гистологическое строение яичников крыс.

а — контрольные самки; б — самки с ГА; в — самки с ГА, получавшие флутамид (1 мг/кг); г — самки с ГА, получавшие менопур (0,01 МЕ) с хорагоном (5 МЕ); д — самки с ГА, получавшие последовательно флутамид (1 мг/кг в течение 10 дней) и менопур (0,01 МЕ) с хорагоном (5 МЕ). Окраска гематоксилином и эозином. ×12.

разования желтых тел в яичниках, но их количество было значительно меньше (3—8, в среднем 5,7 на яичник), чем в контроле (14—23, в среднем 19,7 на яичник). У большинства же самок с ГА введение флутамида не нормализовало функцию яичников. Нередко преовуляторные фолликулы превращались в персистентные, происходила дегенерация фолликулярных клеток с последующим образованием фолликулярных кист (см. рисунок, в). Совокупность этих признаков свидетельствует о недостаточной эффективности восстановления морфологической структуры и генеративной функции яичников у животных с ГА под влиянием введения флутамида в дозе 0,1 мг/кг.

Введение менопура в суточной дозе 0,01 МЕ и хорагона (5 МЕ) самкам с ГА также приводило к появлению эструса в среднем через 2 сут после завершения гормональной стимуляции. Масса яичников составляла 21,1±2,5 мг/кг, т.е. оставалась более чем вдвое меньше нормы (p<0,05). Хотя в яичниках улучшалось состояние фолликулярного эпителия, однако желтых тел было даже меньше

(0—3, в среднем 1 на яичник), чем после введения флутамида. Фолликулы имели признаки персистенции (см. рисунок, г). Вероятно, персистирующие фолликулы вырабатывали достаточное количество эстрогенов, необходимых для корнификации вагинального эпителия, что характерно для стадии эструса. Однако фолликулогенез, как правило, не завершался овуляцией, о чем свидетельствовало отсутствие желтых тел в яичниках у большинства самок данной группы. Таким образом, применяемые дозы гонадотропинов не обеспечивали достаточного стимулирующего влияния в отношении восстановления овуляторных процессов в яичниках крыс с ГА.

Оптимальный лечебный эффект был достигнут в группе животных с ГА, которым последовательно вводили флутамид и гонадотропные препараты. Все самки реагировали восстановлением эструса, из них 58% уже на следующий день после первой инъекции менопура, оставшиеся 42% — через 2 сут после введения хорагона. Наблюдали нормализацию массы яичников (41,2±1,2 мг/100 г) и количества желтых тел (15—20, в среднем 18 на яичник). Гистологическое строение овариальных фолликулов приближалось к норме (см. рисунок, д). Постовуляторные желтые тела присутствовали во всех яичниках, что свидетельствовало о происходящей овуляции. Восстановление эструса и овуляции в яичниках крыс с ГА под влиянием препаратов гонадотропинов после предварительного применения флутамида, наиболее вероятно, связано с ослаблением ингибирующего влияния андрогенов на секрецию эндогенных гонадотропинов и фолликулогенез.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что последовательное применение антиандрогенного препарата флутамида и препаратов гонадотропных гормонов — менопура и хорагона в субтерапевтических дозах — значительно повышает эффективность гонадотропинов в отношении восстановления полового цикла и овуляции у самок крыс с ановуляторным бесплодием гиперандрогенного генеза. Иными словами, установлен потенцирующий эффект нестероидного антиандрогена относительно фармакодинамического действия препаратов гонадотропных гормонов как индукторов овуляции.

Представленная схема гонадотропной стимуляции в некоторой степени имитирует протоколы индукции овуляции, которые используются в вспомогательных репродуктивных технологиях. Позитивные результаты гонадотропной стимуляции, которой предшествовало применение флутамида, могут стать основой для клинического применения этого метода у женщин с ановуляцией, обусловленной гиперандрогенными состояниями, в частности при СПКЯ. Предложенный метод может улучшить результаты гонадотропной стимуляции яичников в схемах контролируемой овуляции или суперовуляции у женщин при сниженной чувствительности яичников к гонадотропинам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Чернуха Г.Е.* Современные представления о синдроме поликистозных яичников. Гинекологическая эндокринология 2002; 4: 8: 24—27.
2. *Homburg R.* Ovulation induction. Expert Opin Pharmacother 2003; 4: 11: 1995—2004.
3. *Yarali H., Zeyneloglu H.B.* Gonadotrophin treatment in patients with polycystic ovary syndrome. Reprod Biomed Online 2004; 8: 5: 528—537.
4. *Szilagyi A., Bartfai G., Manfai A. et al.* Low-dose ovulation induction with urinary gonadotropins or recombinant follicle-stimulating hormone in patients with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 2004; 18: 1: 17—22.
5. *Тарасенко Л.В., Носенко Н.Д., Синицын П.В., Резников А.Г.* Экспериментальная терапия нарушений половой цикличности у крыс с гиперандрогенией. Клин эксперим патология 2004; 3: 2: 140—142 (Укр.).
6. *Татарчук Т.Ф., Ганжий И.Ю., Березовская Е.Т., Шевчук Т.В.* Лечение гиперандрогении как причины нарушения репродуктивного здоров'я женщины. Здоровье женщины 2009; 42: 6: 147—151.
7. *Голота В.Я., Усевич И.А., Тарасенко Л.В., Борис Е.Н.* Применение Флутафарма для лечения гиперандрогении при синдроме склерополикистозных яичников. Репродуктивное здоровье женщины 2008; 37: 3: 139—142 (Укр.).
8. *Резников А.Г., Синицын П.В., Тарасенко Л.В., Полякова Л.И.* Нейроэндокринные механизмы развития экспериментальной ановуляции гиперандрогенного происхождения. Пробл эндокринол 2002; 48: 6: 50—53.
9. *Armstrong D.T., Parkoff H.* Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone. Endocrinology 1976; 99: 1144—1151.