

## Состояние гипофиза кастрированных крыс после аутотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани

В.И. Грищенко<sup>1</sup>, Д.В. Салтовский<sup>2</sup>, В.В. Лазуренко<sup>2</sup>, Г.И. Губина-Вакулик<sup>2</sup>,  
В.Ю. Прокопюк<sup>2</sup>, Н.П. Сухина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

<sup>2</sup>Харьковский государственный медицинский университет

## State of Hypophysis of Castrated Rats After Cryopreserved Ovarian Tissue Autotransplantation

Grischenko V.I.<sup>1</sup>, Saltovsky D.V.<sup>2</sup>, Lazurenko V.V.<sup>2</sup>, Gubina-Vakulik G.I.<sup>2</sup>,  
Prokopyuk V.Yu.<sup>2</sup>, Sukhina N.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Kharkov State Medical University

Представлены результаты экспериментального исследования гипофиза кастрированных крыс. Доказана на животных эффективность применения аутотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани (АКОТ) в лечении посткастрационного синдрома (ПКС).

Представлено результати експериментальних досліджень гіпофізу у щурів після кастрації. Доведена на тваринах ефективність застосування аутотрансплантації криоконсервованої овариальної тканини у лікуванні післякастраційного синдрому.

The results of an experimental investigation of hypophysis of castrated rats are presented. The application efficiency of autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue (ACOT) when treating a post-castration syndrome (PCS) has been proved in animals.

Актуальной проблемой современной гинекологии является лечение посткастрационного синдрома [6]. После удаления яичников ПКС наблюдается у 50-85% женщин [1, 8]

Существует несколько гипотез развития ПКС. Одни авторы связывают его возникновение с резким снижением уровня эстрогенов, другие – с повышенным содержанием фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [5], третьи – недостатком лютеинизирующего гормона (ЛГ) [7].

В то же время не у всех женщин после кастрации при низком уровне эстрогенов [3] и высоких показателях гонадотропинов развивается ПКС. Разноречивы данные относительно значения тиреотропных и адренкортикотропного гормона в возникновении ПКС [6].

В связи с недостаточной обоснованностью патогенеза лечение ПКС в основном симптоматическое, т.е. общеукрепляющая, седативная терапия, или заместительная гормонотерапия (эстрогены и гестагены). Однако известны случаи отрицательного влияния длительного применения гормональных препаратов у женщин репродуктивного возраста [10,11]. Кроме того, нарушается качество их жизни, обусловленное необходимостью ежедневного использования гормонов, постоянным диспансерным наблюдением гинеколога [4].

Целью нашей работы явилась разработка нового немедикаментозного способа лечения синдрома –

The treatment of post-castration syndrome is an actual problem of current gynecology [6]. After the ovary removing the PCS is observed in 50-85% of women [1, 8].

There are some hypotheses of the PCS development. Some authors refer its appearance to a sharp decrease in estrogen level [3], others to an increased content of follicle-stimulating hormone (FSH) [5], the third ones to the lack of luteinizing hormone (LH) [7].

At the same time the PCS does not develop in all women after castration at the estrogen low level and high indices of gonadotropins. The data on thyrotropic and adrenocorticotropic hormone value in the PCS appearance are contradictory [6].

Due to the insufficient substantiation of pathogenesis the PCS treatment is mainly symptomatic, i.e. the generally tonic, sedative therapy or substitution hormone therapy (estrogens and gestagens). However the cases of negative effect of hormone preparations long-term application in women of reproductive age [10, 11] are known. In addition, there is the impairment in their quality of life, stipulated by the necessity of daily hormone usage, constant dispensary observation of gynecologist [4].

The goal of our work was to develop the new non-medicamentous way for the syndrome treating: the ACOT, obtained during an operative intervention. In achieving this aim it was necessary to find out the state of certain endocrine glands after ACOT, of hypophysis in ovariectomised rats in particular.

АКОТ, полученной во время оперативного вмешательства. Для достижения указанной цели необходимо было выяснить состояние некоторых эндокринных желез после АКОТ, в частности, гипофиза у овариоэктомированных крыс.

Экспериментальные исследования проводили на 19 крысах-самках одной линии, одинакового возраста, имеющих обычный рацион питания. Все животные были разделены на 3 группы.

Первая группа включала 6 крыс, которым были удалены матка и яичники. Гистологические исследования гипофиза проводились через 5 нед после кастрации.

Вторую группу составили 8 крыс, которым через 2 нед после кастрации произведена АКОТ, их обследование проводилось через 21 день после АКОТ.

Методика АКОТ заключалась в следующем: яичниковую ткань, полученную при кастрации, замораживали в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  и хранили 14 дней в криобанке [2]. Непосредственно перед трансплантацией ее размораживали и производили подсадку под кожу передней брюшной стенки под эфирным наркозом.

Третью (контрольную) группу составили 5 крыс с нормально функционирующими яичниками.

Гистологическому исследованию подвергался гипофиз крыс с применением гематоксилин-эозиновой окраски, кариометрии с помощью микроскопа "Olympus".

Результаты исследования гипофиза представлены в таблице.

У животных первой группы в аденогипофизе отмечены следующие изменения. Уменьшено общее количество хромофобов; только на переднебоковых периферических участках можно было обнаружить мелкие группки хромофобов (4-5 экз.); в толще аденогипофиза встречались активизирующиеся хромофобы со стимулированным ядром, но малообъемной цитоплазмой. Кроме того, уменьшено общее количество ацидофилов, они выглядели ингибированными: ядро гиперхромное, маленькое, цитоплазма малообъемная; резко увеличено количество базофилов: они крупные, округлые, у большинства ядро с мелкодисперсным гетерохроматином смещено на периферию клетки, а другой "полус" клетки занимает крупный комплекс, что считается признаком типичной клетки кастрации [9].

Ядра эндотелиоцитов капилляров (окруженных клетками кастрации) увеличены в размерах, более светлые, что свидетельствует о высокой транс-

The experimental investigations were carried-out in 19 female rats of one line, of the same age with traditional food regimen. All animals were divided in 3 groups.

The first group included 6 rats with the removed uterus and ovaries. Histological investigations of hypophysis were performed in 5 weeks after castration.

The second group comprised 8 rats, to which the ACOT was carried-out in 2 weeks after castration, their observation was performed in 21 days after ACOT.

The ACOT technique was as follows: the ovarian tissue, procured during castration, was frozen in liquid nitrogen at the temperature of  $-196^{\circ}\text{C}$  and stored for 14 days in cryobank [2]. Directly prior to the transplantation the ovarian tissue was thawed and its grafting was carried-out subcutaneously into the anterior abdominal wall under the ether anesthesia.

The third (control) group comprised 5 rats with normally functioning ovaries.

Hypophysis of rats was subjected to histological investigation using the hematoxylin-eosin staining, karyometry with "Olympus" microscope.

The results of hypophysis investigation are presented in the Table.

In animals of the first group the following changes were observed in adenohypophysis. There was a decreased total number of chromophobs; only on the anteriolateral peripheral sites we could observe slight groups of chromophobs (4-5 units); in the adenohypophysis width we noted the activating chromophobs with a stimulated nucleus, but a low-volume cytoplasm. Besides, there was the reduction of total number of acidophiles, they looked like the inhibited ones: the nucleus was hyperchromic, small, cytoplasm was low-volume; there was a sharp increase in basophile number: they were large, roundish, in the majority of them the nucleus with a finely dispersed heterochromatin was

Площадь ядер аденотропоцитов гипофиза ( $\text{mcm}^2$ ) подопытных животных  
Nuclei surface of adenotropocytes of hypophysis of experimental animals ( $\text{mcm}^2$ )

Группы животных Animal groups	Ацидофилы-соматотропоциты Acidophiles-somatotropocytes	Базофилы-гонадотропоциты Basophiles-gonadotropocytes
Первая First	15,8±0,5	37,5±0,8
Вторая Second	19,1±0,6	34,4±1,1
Третья (контрольная) Third (control)	26,3±0,3	28,7±0,3
P	$P_{1-3} < 0,001$	$P_{1-3} < 0,001$
	$P_{2-3} < 0,05$	$P_{2-3} < 0,05$
	$P_{1-2} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$

портной нагрузке на эндотелиоциты, местами эндотелий слущен, в просвете капилляров часто можно было увидеть аморфное базофильное вещество, что, очевидно, является гонадотропным субстратом. Довольно часто обнаруживались базофилы с пикнотичным ядром и с явлением маргинации хроматина, а также с частично лизированной цитоплазмой – апоптоз “изношенных” клеток; отмечалось наличие увеличенного количества макрофагов в строме аденогипофиза.

У животных второй группы выявляли следующие изменения микроструктуры аденогипофиза: увеличение общего количества хромофобов, они обнаруживались не только в периферических переднебоковых участках, но и в центральных, причем группы хромофобов более многочисленны; увеличение количества ацидофилов с крупными светлыми ядрами; хотя базофилы и выглядели доминирующими в аденогипофизе, но общее их количество стало меньше, чем в группе животных, не подвергавшихся лечению АКОТ, также уменьшилось количество базофилов с признаками деструкции. Кроме того, обнаруживались группы базофилов, теряющих свою дифференцировку и превращающихся в хромофобы: уменьшался объем цитоплазмы, ядра становились угловатыми, гиперхромными.

Таким образом, в проведенном эксперименте удаление яичников животным обусловило ожидаемое изменение гипофиза (появление гиперактивных гонадотропоцитов вследствие отсутствия тормозящего действия периферических половых гормонов по принципу отрицательной обратной связи). Применение АКОТ значительно уменьшило морфофункциональную напряженность гонадотропоцитов. Одновременно необходимо отметить происходящее при кастрации ингибирование в аденогипофизе аденокортикоцитов других типов, тогда как в промежуточной доле происходят, вероятно, компенсаторно по отношению к подавленным аденокортикоцитам резкая активация клеток, продуцирующих ФСГ, активация вплоть до апоптоза заметного их количества в связи с перенапряженным функционированием, изношенностью. Выраженную порозность нейрогипофиза можно трактовать как морфологическое проявление стимуляции выведения гипоталамических нейропептидов – вазопрессина и окситоцина. Имплантированный яичник существенно уменьшает морфофункциональные сдвиги не только в аденогипофизе, но и нейрогипофизе, в промежуточной доле, что подтверждается данными гистологического обследования животных контрольной группы.

Следовательно, удаление яичников у лабораторного животного вызывает не только пере-

shifted to the cell periphery, and another cell “pole” occupied the large complex, that was considered as the sign of typical castration cell [9].

Endotheliocyte nuclei of capillaries (surrounded with castration cells) have an increased size, are lighter, that testifies to a high transport charge on endotheliocytes, here and there endothelium is exfoliated, in the capillary lumen we could often see an amorphous basophile substance, that was, probably, a gonadotropic substrate. Quite often there were observed the basophiles with a pyknotic nucleus and a phenomenon of chromatin margination, as well as with a partially lysed cytoplasm: apoptosis of “obsolescent” cells; there was observed the presence of an increased number in macrophages in adenohypophysis stroma.

In the second group of animals there were found out the following changes in adenohypophysis microstructure: the augmentation of total chromophob number, they were revealed not only in peripheral anteriolateral sites, but in central ones, moreover the groups of chromophobs were more numerous; an increase in acidophile number with large light nuclei; though basophiles looked like dominant ones in adenohypophysis, their total number was smaller, than in the group of animals, not subjected to the ACOT treatment, there was the reduction of basophile number with destruction signs as well. Besides, there were revealed the groups of basophiles, losing their differentiation and transforming into chromophobs: there was a decrease in cytoplasm volume, nuclei became angular and hyperchromic. Thus, in the experiment conducted the ovary removal in animals stipulated the expected change in hypophysis (appearance of hyperactive gonadotropocytes due to the absence of an inhibiting effect of peripheral sexual hormones according to the principle of negative inverse connection). The ACOT application considerably decreased morphofunctional tension rate of gonadotropocytes. At the same time we should note the occurring at the castration inhibition in adenocorticotropocytes adenohypophysis of other types, meanwhile in an intermediate lobe there is a sharp cell activation, producing FSH, probably in respect to the suppressed adrenocorticotropocytes, the activation up to apoptosis of their visible number due to the overtense functioning and obsolescence.

The implanted ovary significantly reduces the morphofunctional shifts not only in adenohypophysis, but in neurohypophysis as well, in an intermediate part, that is confirmed by data of histological observation of animals of control group.

Consequently, the ovary removal of laboratory animal causes not only the overtension of hypophysis gonadotropic function, but other regular changes due to the existence in the organism of numerous targets for sexual hormones effect, which main source is

напряжение гонадотропной функции гипофиза, но и другие закономерные гормональные изменения в связи с существованием в организме многочисленных мишеней действия половых гормонов, главный источник которых удалён, а также с подавлением других тропных функций адено-гипофиза из-за гипердифференцировки гонадотропцитов.

Таким образом, можно предположить, что применение АКОТ дает возможность инициировать запуск циклических механизмов гипоталамо-гипофизарных структур, позволяет улучшить в морфофункциональном состоянии все доли гипофиза, вероятно, путем изменения концентрации продуцируемых им гормонов в организме кастрированных крыс, что требует проведения дальнейших исследований. Данный метод может быть использован в клинической практике после предварительной апробации.

### Литература

1. *Вихляева Е.М.* Климактерический синдром. Руководство по эндокринной гинекологии. – М.: Мед. информ. агентство, 2000. – С. 603-650.
2. *Грищенко В.И., Демина Л.Г., Чадаев В.Е. и др.* Создание банка криоконсервированной овариальной ткани человека для аллогенных трансплантаций в акушерско-гинекологической практике // Криобиология. – 1987. – №3. – С. 7-11.
3. *Ильина Э.М., Ткаченко Н.М.* О возможной роли тиреотропин рилизинг-гормона в патогенезе “приливов” при климактерическом синдроме // Акушерство и гинекология. – 1986. – №5. – С. 32-35.
4. *Крыжановская И.О., Крацова Т.Я., Лебеденко Е.Ю. и др.* Гормономодулирующий и иммунокорректирующий эффекты гормонозаместительной терапии урогенитальных нарушений у женщин в постменопаузе // Вестн. Рос. ассоциации акушеров-гинекологов. – 1999. – №1. – С. 59-63.
5. *Кулаков В.И., Алыханова З.М., Ткаченко Н.М. и др.* Изменение механизмов вегетативной регуляции у больных после тотальной овариэктомии на фоне трансплантации фетальных тканей человека // Акушерство и гинекология. – 1996. – С. 37-40.
6. *Кулаков В.И., Сметник В.П.* Руководство по климактерию. – М.: Мед. информ. агентство. – 2001. – С. 641-642.
7. *Рубченко Т.И., Ленарский Е.А., Ларичева И.П. и др.* Эффективность различных методов денситометрии в прогнозировании и ранней диагностике остеопороза у женщин с хирургической и естественной менопаузой // Вестн. Рос. ассоциации акушеров-гинекологов. – 1999. – №4. – С. 103-107.
8. *Сметник В.П., Балан В.Е., Бутарева Л.Б.* О патогенезе и лечении некоторых форм климактерического синдрома // Акушерство и гинекология. – 1986. – №7. – С. 34-37.
9. *Хем А., Корман Д.* Гистология. Т.5. – М.: Мир, 1983. – 293 с.
10. *Hulley S., Grady P., Bush T. et al.* Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women // J.A.M.A. – 1998. – Vol.280. – P. 605-613.
11. *Vassilopoulou-Sellin R., Theriault R., Klein M.J.* Estrogen replacement therapy in women with prior diagnosis and treatment of breast cancer. // Gynecol. Oncol. – 1997. – V.65. – P. 89-93.

Поступила 12.11.2002

removed, and relating to suppression of other tropic functions of adenohipophysis due to the donadotropocyte hyperdifferentiation.

Thus, it can be supposed, that the ACOT application provides the possibility to initiate the trigger of cyclic mechanisms of hypothalamo-hypophysial structures, allows to improve all parts of hypophysis in morphofunctional state, probably, by means of the change in the concentration of produced by it hormones in the castrated rats' organism, that requires to carry-out the further investigations. This method can be used in clinical practice after preliminary trials.

### References

1. *Vikhlyeva E.M.* Climacteric syndrome: Manual on endocrine gynecology. - M.: Meditsinskoe Informatsionnoe agentstvo, 2000. – P. 603-650.
2. *Grischenko V.I., Demina L.G., Chadayev V.E. et al.* Creation of bank of human cryopreserved ovarian tissue for allogenic transplantation in obstetrical and gynecological practice // Kriobiologiya. – 1987. – N3. – P. 7-11.
3. *Ilijina E.M., Tkachenko N.M.* On possible role of thyrotrophin releasing-hormone in pathogenesis of “hot flush” at climacteric syndrome//Akusherstvo i ginekologiya. – 1986. – N5. – P. 32-35.
4. *Kryzhanovskaya I.O., Kravtsova T.Ya., Lebedenko E.Yu. et al.* Hormone-modulating and immune-correcting effects of hormone-substitutive therapy of urogenital disorders in women in postmenopause//Vestnik Rossijskoj assotsiatsii akusherov i ginekologov. – 1999. – N1. – P. 59-63.
5. *Kulakov V.I., Alikhanova Z.M., Tkachenko N.M. et al.* Change in the mechanisms of vegetative regulation in patients after total ovariectomy at the background of human fetal tissue transplantation//Akusherstvo i ginekologiya. – 1996. – P.37-40.
6. *Kulakov V.I., Smetnik V.P.* Manual on climacterium. - Meditsinskoe Informatsionnoe agentstvo, 2001. – P. 641-642.
7. *Rubchenko T.I., Lenarsky E.A., Laricheva I.P. et al.* Efficiency of different methods of densitometry in osteoporosis forecasting and early diagnosis in women with surgical and natural menopause // Vestnik Rossijskoj assotsiatsii akusherov i ginekologov. – 1999. – N4. – P. 103-107.
8. *Smetnik V.P., Balan V.E., Butareva L.B.* On pathogenesis and treatment of certain forms of climacteric syndrome// Akusherstvo i ginekologiya. – 1986. – N7. – P. 34-37
9. *Khem A., Korman D.* Histology. M.: Mir. Vol. 5. – 1983. – 293 p.
10. *Hulley S., Grady P., Bush T. et al.* Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women // J.A.M.A. – 1998. – Vol.280. – P. 605-613.
11. *Vassilopoulou-Sellin R., Theriault R., Klein M.J.* Estrogen replacement therapy in women with prior diagnosis and treatment of breast cancer // Gynecol. Oncol. – 1997. – Vol.65. – P.89-93.

Accepted in 12.11.2002