

ОСОБЛИВОСТІ ІНДУКЦІЇ СУПЕРОВУЛЯЦІЇ, КІЛЬКІСНА І МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ У МИШЕЙ З ХРОНІЧНИМ РЕАКТИВНИМ ЗАПАЛЕННЯМ ЯЄЧНИКІВ

М.Г.Грищенко

Харківський національний медичний університет

Ключові слова: суперовуляція; ооцит; ембріон; запалення; безпліддя

Актуальною проблемою сучасної репродуктології є вивчення патогенетичних механізмів порушення репродуктивної функції з метою збільшення ефективності лікування безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) у пацієнтів з безпліддям, обумовленим хронічними захворюваннями органів малого тазу. Метою цього дослідження було вивчення впливу реактивного хронічного запалення яєчників на результати індукції суперовуляції, кількісні та якісні характеристики ооцитів та ембріонів у мишей в експерименті. Виявлено, що хронічне запалення яєчників у самок мишей чинить виражений вплив на результати індукції суперовуляції, при цьому істотно знижується кількість ооцитів, зигот і 2-клітинних ембріонів, а також відмічається тенденція до погіршення морфології ембріонів. Отримані дані свідчать про те, що хронічний запальний процес у малому тазу чинить суттєвий негативний вплив на досліджені показники ДРТ. Актуальним є пошук патогенетичних способів терапії, спрямованих на поліпшення результатів лікування при безплідді запального генезу.

Хронічні запальні захворювання органів малого тазу (ХЗЗОМТ) як причина безпліддя не втрачають своєї актуальності протягом багатьох років. Обумовлена така актуальність тим, що частота запальних процесів у малому тазу не має тенденції до зниження і складає 74-80% гінекологічної патології [3]. Більшість пацієток — сексуально активні жінки репродуктивного віку. При цьому навіть один епізод захворювання призводить до безпліддя в 5-18% випадків [4, 5]. Гострі запальні процеси мають тенденцію переходити у хронічні та набувають тривало, уповільненого перебігу.

У теперішній час у клініці репродуктивної медицини допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) вийшли на передові позиції. Тим не менше, ефективність ДРТ все ще далека від абсолютної. В Україні в 2006 р. результативність лікування безпліддя методом екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) склала 33,5% [6].

Ефективність корекції порушень репродуктивної функції, обумовлених перенесеними ХЗЗОМТ, за допомогою ДРТ, на перший погляд, повинна бути дуже високою. Адже гострий і активно-хронічний процес вже завершився, а анатомічні та функціональні порушення стану маткових труб не повинні мати істотного впливу, тому що яйцеклітина минає маткову трубу, і ембріон потрапляє безпосередньо в матку. Тим не менше, існуючі літературні дані свідчать, що частота позитивних результатів при трубно-перитонеальному безплідді недостатньо висока, а запальні захворювання органів малого тазу як причина безпліддя є обтяжливим чинником, який негативно впливає на результати лікування [10, 13]. Причина такого зниження, можливо, криється в наслідках перенесених запалень, які не обмежуються порушенням анатомічного і функціонального стану маткових труб. Можна припустити, що ця група

хворих має клініко-анамнестичні особливості та відмінності гормонального та імунного гомеостазу від пацієток з іншими причинами безпліддя. Актуальною проблемою є визначення патогенетичних механізмів порушення репродуктивної функції та особливостей лікування безпліддя з використанням ДРТ у пацієток з ХЗЗОМТ з метою збільшення їх ефективності.

Оскільки вивчення стану репродуктивних клітин людини пов'язане з низкою морально-етичних і технічних складностей, особливої актуальності набуває проблема моделювання хронічного запалення репродуктивних органів у експериментальних тварин в умовах, максимально наближених до тих, що відбуваються в організмі жінки при проведенні ДРТ.

Літературні дані свідчать, що модель ЕКЗ на мишах добре відтворюється, метаболізм ембріонів миші, розвиток до стадії бластоцисти, а, отже, і умови культивування у ембріонів людини і миші мають багато спільного. У теперішній час модель ЕКЗ на мишах

Таблиця 1

**Кількісні результати індукції суперовуляції у мишей
в контрольній та експериментальній групах, n=9**

Групи тварин	Кількість тварин у групі	Кількість зрілих ооцитів (МІІ)	
		загальна кількість ооцитів	кількість ооцитів на 1 тварину (M±m)
Контроль	5	82	16,4±1,06
I група	4	43	10,7±2,1*

Примітка. * — $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

є загально визнаним інструментом тестування якості лабораторного обладнання та середовищ культивування, які застосовуються у лабораторіях ДРТ. Саме тому лабораторна миша є адекватною клінічної моделлю для вивчення основних етапів ДРТ-індукції суперовуляції, стану гамет і подальшого розвитку ембріонів [8, 9].

Метою цього дослідження було вивчення впливу процесів хронічного реактивного запалення яєчників на індукцію суперовуляції і стан ооцитів та ранніх ембріонів лабораторних мишей в експерименті.

Матеріали та методи

Досліди проводили на самках мишей гібриду F₁ (СВАхС57В1) з масою 18-20 г. Були виділені дві групи: контрольна (14 тварин) та експериментальна (12 тварин). З метою моделювання хронічного запалення яєчників тваринам експериментальної групи одноразово вводили внутрішньоочеревинно 1 мг λ -карагеніну ("Sigma", США) в 0,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію згідно з оригінальною методикою [2].

На 21-у добу розвитку експериментального запалення у тварин викликали суперовуляцію шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції 5 МО гонадотропіну сироватки жеребних кобил (ГСЖК) ("Foligon", Нідерланди) і 7,5 МО людського хоріонічного гонадотропіну (лХГ) ("Chorulon", Нідерланди) з інтервалом між ін'єкціями 46-48 год. У тварин контрольної групи індукцію суперовуляції проводили аналогічним чином. Виділення ооцитів і ембріонів миші здійснювали за стандартною методикою [1]. Ооцити у складі ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК)

виділяли через 12-13 год після ін'єкції лХГ шляхом проколювання ампулярного відділу відпрепарованих яйцепроводів у теплому фосфатно-буферному середовищі Дюльбекко з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (ФСТ, "Sigma", USA). Для видалення клітин кумулюсу використовували теплий (37°C) розчин гіалуронідази ("Sigma", USA) з концентрацією 0,1 мг/мл (150 од/мл), виготовлений на фізіологічному середовищі Дюльбекко протягом 2-5 хв. Для отримання ембріонів самок після ін'єкції лХГ для осіменіння підсаджували до самців тієї ж лінії на 12 год. День виявлення копуляційної пробки вважався першим днем вагітності. Зиготи отримували через 24 год після ін'єкції лХГ. Ембріони на стадії двох клітин отримували через 48 год після ін'єкції лХГ. Отримані ооцити та ембріони тричі відмивали в культуральному середовищі і негайно проводили їх аналіз.

Стан отриманих ооцитів і ранніх ембріонів оцінювали за морфологічними критеріями при люмінесцентній мікроскопії (LSM-510 META, "Carl Zeiss", Німеччина).

Експерименти на тваринах проводили за регламентом, розробленим відповідно до "Спільних принципів експериментів на тваринах", схвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001 р.) та узгоджених з положеннями "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, Франція, 1985).

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стьюдента. У розрахунках використовували пакет статистич-

ного аналізу даних програми "Excel-2007".

Результати та їх обговорення

При аналізі отриманих результатів найбільш значимі та достовірні відмінності між виділеними групами були виявлені за такими показниками, як рівень виходу зрілих ооцитів на стадії МІІ мейозу і кількість ранніх ембріонів, отриманих у результаті гормональної стимуляції яєчників.

У табл. 1 представлені результати кількісної оцінки виходу зрілих ооцитів миші (через 13 год після введення лХГ) у контрольній та експериментальній групах тварин.

Як видно з представлених даних, у групі I було отримано статистично достовірно менше ооцитів у перерахунку на 1 тварину, ніж у контрольній групі. Таким чином, порівняльна оцінка рівнів виходу ооцитів у тварин контрольної та експериментальної груп дозволяє стверджувати, що присутність хронічного запального процесу призводить до погіршення "відгуку" яєчників на стимуляцію гонадотропінами, що знаходить відображення в достовірному зменшенні кількості одержуваних ооцитів.

У табл. 2 наведені результати кількісної та морфологічної оцінки презумптивних зигот миші (одноклітинних ембріонів), отриманих від тварин контрольної та експериментальної груп.

Як видно з представлених даних, кількість одноклітинних ембріонів, отриманих від однієї самки миші в контрольній групі, достовірно перевищує кількість зигот, отриманих у групі I (24,0±4,2, і 11,3±2,3 відповідно, $p < 0,05$).

У контрольній групі тварин 69,4% зигот знаходилися на стадії, коли в них можна було побачити пронуклеуси, які зближуються, що відповідало нормальній морфології для зигот, виділених через 24 год після введення лХГ. В експериментальній групі тварин цей показник достовірно не відрізнявся від контролю і складав 73%. Кількість зигот аномальної морфології згідно з візуальною оцінкою (наявність

Таблиця 2

Кількісна і морфологічна оцінка одноклітинних ембріонів, отриманих у результаті індукції суперовуляції у виділених групах тварин, n=7

Групи тварин	Кількісна і морфологічна характеристика одноклітинних ембріонів			
	загальна кількість одноклітинних ембріонів	кількість одноклітинних ембріонів на 1 тварину (M±m)	кількість ембріонів з нормальною морфологією (%)	кількість ембріонів аномальної морфології (%)
Контроль (n=3)	72	24,0±4,2	50 (69,4%)	22 (30,5%)
I група (n=4)	45	11,3±2,2*	33 (73%)	12 (26,6%)

Примітка. * — $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

Таблиця 3

Кількісна і морфологічна оцінка ембріонів на стадії двох клітин, отриманих у результаті індукції суперовуляції у виділених групах тварин, n=10

Групи тварин	Кількісна і морфологічна характеристика 2-клітинних ембріонів			
	загальна кількість ембріонів	кількість ембріонів на 1 тварину (M±m)	кількість ембріонів нормальної морфології, (%)	кількість ембріонів аномальної морфології, (%)
Контроль (n=6)	166	27,7±0,4	122 (73,5%)	44 (26,5%)
I група (n=4)	58	14,5±2,6*	41 (70,6%)	17 (29,3%)

Примітка. * — $p < 0,01$ у порівнянні з контролем

фрагментарних форм за типом “виноградного грона”) в контрольній та експериментальній групах тварин складала відповідно 30,5% і 26,5%. Достовірних відмінностей між групами за цими показниками виявлено не було ($p > 0,05$).

При аналізі кількісних показників виходу ембріонів на стадії двох бластомерів у виділених групах було виявлено, що кількість 2-клітинних ембріонів на 1 тварину в контрольній групі достовірно вище, ніж в експериментальній ($p < 0,01$) (табл. 3).

При оцінці морфології 2-клітинних ембріонів використовували критерії, запропоновані Egenus [7]. До ембріонів з нормальною і задовільною морфологією відносили клітини без ознак фрагментації або з незначною (до 25%) фрагментацією цитоплазми, які мають рівні, чіткі, сферичні бластомери. Незадовільними вважали ембріони з фрагментацією цитоплазми більше 25% за типом “виноградного грона”, що є марке-

ром пізньої стадії апоптозу. Як правило, в таких ембріонах відзначалася наявність вакуолей, невідповідність розмірів бластомерів до термінів культивування, ознаки дегенерації.

За показником кількості ембріонів з аномальною морфологією в експериментальній і контрольній групі достовірних відмінностей виявлено не було.

Відомо, що якість ооцитів і подальша доля ембріонів, що розвиваються, залежить від великої кількості факторів: стану і віку самок-донорів, генетичної лінії мишей, умов і складу середовища інкубації, впливу екзогенних гонадотропних гормонів на процес овуляції. Якість ооцитів, у свою чергу, впливає на здатність ембріонів після запліднення до подальшого дроблення. Ембріони, які мають різні пошкодження, віддаються в процес розподілу дроблення шляхом апоптозу [11, 12].

Раніше було доведено, що розроблений і використаний у даній

роботі метод моделювання реактивного хронічного запалення яєчників у мишей викликає у тварин досить виражені запальні явища в яєчниках та оточуючих їх тканинах, що істотно впливає на їх функцію [2]. Як показали результати даного дослідження, індукція хронічного запалення у самок мишей істотно знижує кількість ооцитів, зигот і 2-клітинних ембріонів.

Достовірних відмінностей у морфологічних характеристиках ембріонів між контрольною та експериментальною групами тварин у нашому експерименті не було виявлено. Можна говорити лише про тенденції до зниження якості ембріонів у групі з експериментальним запаленням. Наявна тенденція до погіршення морфології ембріонів може свідчити про запуск апоптозних реакцій як у яєчниках, так і в ооцитах, отриманих у результаті індукції суперовуляції. Можна припустити, що основний каскад апоптозних реакцій, тригером яких є хронічне запалення, виявляється, головним чином, в атрезії примордіальних фолікулів, зниженні їх рецетивності до гонадотропнів і, як наслідок, у зменшенні кількості ооцитів після індукції суперовуляції.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження показали, що хронічне реактивне запалення яєчників у самок мишей чинить виражений вплив на результати індукції суперовуляції. У тварин з модельованим запаленням яєчників достовірно знижується кількість одержуваних ооцитів ($p < 0,05$), зигот ($p < 0,05$) і 2-клітинних ембріонів ($p < 0,01$) при індукції суперовуляції. Можна говорити про тенденції до погіршення морфології ембріонів на тлі запального процесу.

Отримані дані свідчать про те, що хронічний запальний процес у малому тазу чинить суттєвий негативний вплив на досліджені показники ДРТ. Актуальним є пошук патогенетичних способів терапії, спрямованих на поліпшення результатів лікування при безплідді запального генезу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биология развития млекопитающих. Методы / Под ред. М.Манк. — М.: Мир, 1990. — 406 с.
2. Грищенко Н.Г., Клименко Н.А., Гоголь Н.И., Татарко С.В. // Теоретична і експериментальна медицина. — 2009. — №4. — С. 10-17.
3. Дубоссарская З.М., Миляновский А.И., Коляденко В.Г. Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов. — К.: Здоров'я, 1991. — С. 115-118.
4. Іванюта Л.І. Репродуктивне здоров'я і неплідність // Мистецтво лікування. — 2004. — №4. — С. 26-30.
5. Основы репродуктивной медицины: Практ. руковод. / Под ред. проф. В.К.Чайки. — Донецк: ООО "Альматео", 2001. — 618 с.
6. Юзько О.М., Жилка Н.Я., Руденко Н.Г. та ін. // Жіночий лікар. — 2007. — №3. — С. 8-12.
7. Erenus M., Zouves C., Rajamahendran P. et al. // Fertil. Steril. — 1991. — Vol. 56. — P. 707-710.
8. Neuber E., Powers R.D. // Hum. Reprod. — 2000. — Vol. 15, №1. — P. 171-174.
9. Quinn P., Horstman F.C. // Hum. Reprod. — 1998. — Dec.; 13 Suppl. 4. — P. 173-183.
10. Strandell A., Bergh C., Lundin K. // Hum. Reprod. — 2000. — Vol. 15, №12. — P. 2520-2525.
11. Takase K., Ishikawa M., Hoshiai H. // Tohoku J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 175. — P. 69-76.
12. Van der Auvera, D'Hooghe T. // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16, №6. — P. 1237-1243.
13. Yang X.E., Zhang S.Y. // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. — 2007. — Oct; 42 (10). — P. 666-669.

Адреса для листування: 61022, м. Харків,
пр. Леніна, 4. Тел. (57) 712-45-22.
Харківський національний медичний університет

Надійшла до редакції 15.10.2010 р.

Автор висловлює подяку с.н.с. Коваленко І.Ф., н.с. Холодному В.С., н.с. Чернищенко Л.Г., н.с. Волкову Н.А. за методичну допомогу в роботі, с.н.с. Гончарук Є.І. і с.н.с. Смольяніновій Є.І. за допомогу в плануванні та обговоренні результатів роботи (Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАНУ, м. Харків)