

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ САМОК МИШЕЙ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЇ АНЕМІЇ

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України (м. Київ)

*Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ)

**Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

Робота виконана в межах Договору про співробітництво та організацію взаємовідносин між Інститутом біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України та Інститутом фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Вступ. Незважаючи на інтенсивний розвиток та досягнення сучасної медицини дефіцит заліза та залізодефіцитна анемія (ЗДА) продовжують залишатися однією з глобальних проблем людства [1, 3, 6, 13, 15]. Так, дефіцит заліза зустрічається майже у третини жителів Землі, а на долю залізодефіцитної анемії припадає 80-90 % від усіх анемії [9, 13, 15].

Залізодефіцитна анемія – захворювання системи крові, яке зумовлене дефіцитом заліза в організмі та супроводжується змінами параметрів його метаболізму, зменшенням концентрації гемоглобіну в еритроцитах, кількісними та якісними їх змінами, клінічними проявами анемічної гіпоксії, сидеропенії та метаболічної інтоксикації. Всесвітня організація охорони здоров'я, Дитячий фонд Організації Об'єднаних Націй та Університет Організації Об'єднаних Націй визначають анемію – як «захворювання, при якому спостерігається зниження концентрації гемоглобіну принаймні на два стандартні відхилення від середньої концентрації гемоглобіну для нормальної популяції з подібною статевістю і віковою структурою» [3].

Загальновідомим є той факт, що однією з найбільш уразливих груп щодо розвитку залізодефіцитних станів є жінки репродуктивного віку та вагітні жінки [7, 8]. При цьому, основною причиною розвитку залізодефіцитних анемії у жінок репродуктивного віку вважаються крововтрати різної етіології, зокрема, значні маткові кровотечі внаслідок перебігу різноманітних гінекологічних захворювань [4, 7, 8].

Так, залізодефіцитні анемії різного ступеню важкості діагностують у пацієнток з міомами матки, гіперпластичними процесами ендометрію, дисфункціональними матковими кровотечами, ендометріозом, дисфункцією яєчників, тощо [2, 4, 7, 8, 13].

Разом з тим, питання щодо первинної ролі залізодефіцитного стану та розвитку залізодефіцитної анемії у формуванні патологій

органів жіночої репродуктивної системи висвітлено недостатньо.

У зв'язку з цим, **метою дослідження** була оцінка функціонального стану органів жіночої репродуктивної системи дослідних тварин за умов моделювання залізодефіцитної анемії.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди з оцінки стану органів жіночої репродуктивної системи за умов моделювання залізодефіцитної анемії проводили з використанням самок мишей лінії BALB/c з початковою масою 15-16 г. ЗДА моделювали шляхом утримання дослідних тварин на залізодефіцитній дієті протягом 2 місяців. Корм та дистильовану воду тварини отримували *ad libitum*. Контрольних умовно-здорових тварин утримували на дієті з нормальним вмістом заліза [10, 12, 14].

Дослідження на тваринах проводили із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України № 66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV.

Концентрацію гемоглобіну (г/л) в крові дослідних тварин визначали геміхромним методом з використанням набору стандартного діагностикуму для клініко-діагностичних та біохімічних лабораторій виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна) згідно протоколів виробника. Вимірювання оптичної щільності проб здійснювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-3 (Росія).

Підрахунок еритроцитів та визначення гематокриту в крові дослідних тварин проводили за стандартними методиками згідно [5].

Стан органів репродуктивної системи дослідних тварин оцінювали за показниками мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* та скоротливості міометрію.

Для аналізу мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* з яєчників мишей виділяли і підраховували ооцити (без кумулюсних клітин або в складі кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексів).

Морфологічні дослідження ооцитів проводили під мікроскопом МБС-10 (Росія). Визначали стан зародкового пухирця; перивітелінового простору та цитоплазми, а саме: щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Контрольні і експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 0,4 мл культурального середовища DME з 15 ммоль/л NEPES, концентрація кальцію 1,71 ммоль/л, температура 37 °С, тривалість 20 год). Після 2 год культивування підраховували ооцити (у% до загальної кількості), що перебували на стадії метафази I – розчинення зародкового пухирця, а після 20 год – на стадії метафази II – формування першого полярного тільця.

Дослідження скоротливої активності міометрію проводили із застосуванням методу фазнографічного аналізу.

Для реєстрації сили ізометричних скорочень ізольовані смужки цервікального (ЦВ) і оваріального (ОВ) відділів матки перенесли в камеру, фіксували і з'єднували із консолою механоелектричного перетворювача сили в електричний сигнал. Камеру перфузували розчином Кребса (37°C, рН 7,29). Силу ізометричних скорочень реєстрували за допомогою швидкодіючого самописця Н3021-3. Рівномірність перфузії препарату омиваючими розчинами забезпечувалась перистальтичним насосом НП-1М. Під час експерименту здійснювали термостатування розчинів і експериментальної плексигласової камери в цілому. Препарати, не здатні скорочуватись спонтанно протягом 20-25 хв впрацювання, виключали із експерименту (<5%). Базову активність реєстрували протягом 20 хв.

Для кількісної характеристики спонтанних фазних скорочень використовували наступні параметри скоротливої активності: амплітуда скорочення (А, мН), частота скорочення (ЧС, кількість за секунду), тривалість активного стану (Т, с), швидкість скорочення (CVmax, мН/с) і швидкість розслаблення (RVmax, мН/с).

Індекс скоротливості (IC, мН) – добуток амплітуди скорочення на відношення швидкості скорочення до швидкості розслаблення розраховували за формулою: $IC = F_{max} \cdot CV_{max} / RV_{max}$.

Перевірку отриманих даних на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова – Смирнова. За нормального розподілу статистичну обробку результатів при порівнянні двох груп даних проводили з використанням критерію t Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Зміни показників вважали статистично вірогідними з рівнем значимості понад 95% ($p < 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення. Згідно даних Всесвітньої Організації Охорони

Таблиця

Маркерні показники крові самок мишей лінії BALB/с після двох місяців утримування на залізодефіцитній дієті

Групи тварин	Маркерні показники крові		
	Еритроцити Ч10 ⁶ /мл	Гемоглобін г/л	Гематокрит, %
Контрольні умовно-здорові тварини	9,9±0,06	151,2±1,9	42,84±0,49
Експериментальні тварини, що утримувались на залізодефіцитній дієті	8,6±0,45*	138,7±4,3*	39,53±0,97*

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю.

Здоров'я, хронічний дефіцит потрапляння заліза в організм є найбільш розповсюдженою причиною розвитку залізодефіцитної анемії за відсутності інших супутніх патологій [9, 11, 13, 15]. Тому, для моделювання залізодефіцитної анемії експериментальних тварин в дослідженнях була використана залізодефіцитна дієта.

В таблиці наведені дані маркерних показників крові (концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів та гематокриту) дослідних тварин після двох місяців утримування на залізодефіцитній дієті, порівняно із показниками контрольних тварин, які утримувались на дієті з нормальним вмістом заліза.

Так, отримані дані засвідчили, що у тварин, які протягом двох місяців утримувались на залізодефіцитній дієті, спостерігалось зниження концентрації гемоглобіну в крові в середньому на 10%, порівняно із значенням цього показника для умовно-здорових тварин.

Вміст еритроцитів в крові дослідних тварин знижувався на 13%, порівняно із контролем, а гематокрит – в середньому на 8%.

Отримані результати свідчать про розвиток залізодефіцитного стану у дослідних тварин із початковими проявами анемії.

Разом з тим, аналіз функціонального стану органів репродуктивної системи дослідних тварин, що утримувались на залізодефіцитній дієті, на цьому фоні виявив виражені патологічні зміни як за показниками мейотичного дозрівання ооцитів, так і за дослідженими параметрами скоротливості міометрію матки.

Так, у дослідних тварин було виявлено зменшення майже у 2 рази кількості ооцитів, які виділялися з одного яєчника: значення цього показника становило $8,0 \pm 1,0$ ($p < 0,01$) шт/яч при $15,0 \pm 1,0$ шт/яч в контролі (рис. 1).

Крім того, розвиток залізодефіцитної анемії у дослідних тварин призводив до зменшення відсотка ооцитів на стадії метафази I (з розчиненням зародковим пухирцем) до $49,01 \pm 5,44\%$ при $74,08 \pm 1,98\%$ в контролі, а також зменшення відсотка ооцитів на стадії метафази II (формування першого полярного тільця) до $15,03 \pm 2,48\%$ при $55,88 \pm 3,85\%$ в контролі ($p < 0,01$ та $p < 0,001$ відповідно) (рис. 1).

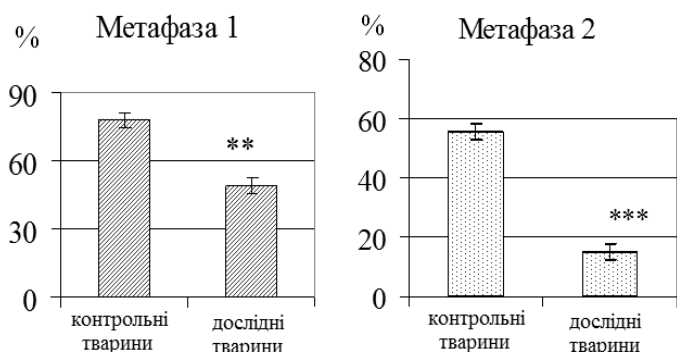


Рис. 1. Мейотичне дозрівання ооцитів на стадії метафази I та стадії метафази II у самок мишей лінії BALB/c після двох місяців утримування на залізодефіцитній дієті.

Примітка: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольних тварин ($n = 4$).

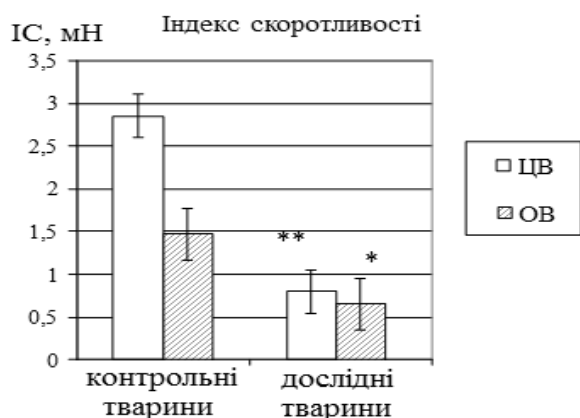


Рис. 2. Індекс скоротливості (ІС, мН) цервікального відділу (ЦВ) та оваріального відділу (ОВ) міометрію матки самок мишей лінії BALB/c після двох місяців утримування на залізодефіцитній дієті

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольних тварин ($n = 4$).

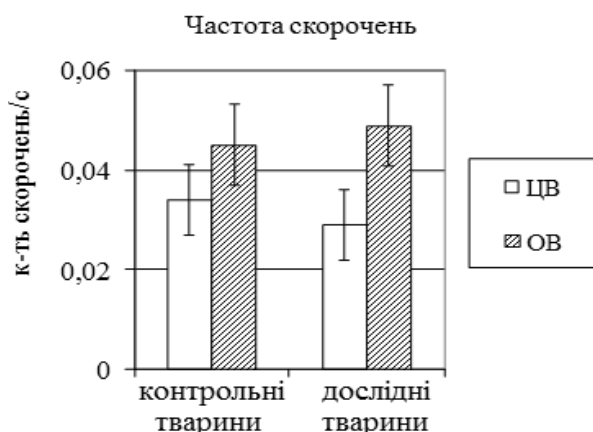


Рис. 3. Частота скорочень (ЧС, кількість скорочень за секунду) цервікального відділу (ЦВ) та оваріального відділу (ОВ) міометрію самок мишей лінії BALB/c після двох місяців утримування на залізодефіцитній дієті ($n = 4$).

Таким чином, у дослідних тварин, які утримувались протягом двох місяців на залізодефіцитній дієті, розвиток залізодефіцитного стану призводив до вираженого зменшення кількості ооцитів в яєчнику та пригнічення у них мейотичного дозрівання як на стадії Метафази I, так і на стадії Метафази II, порівняно з контролем.

Виражені патологічні зміни було виявлено і при аналізі скоротливості міометрію матки дослідних тварин – як для ЦВ так і для ОВ матки.

Так, у ЦВ матки тварин із модельною анемією встановлено зменшення у 3 рази величин амплітуди скорочення (до $0,48 \pm 0,09$ мН ($p < 0,001$) при $1,50 \pm 0,09$ мН в контролі).

Пригнічення більш ніж у 3 рази було виявлено і при визначенні ІС. Значення цього показника сягало $0,82 \pm 0,08$ мН ($p < 0,01$) для дослідних тварин при $2,8 \pm 0,08$ мН в контролі (рис. 2).

Окрім параметрів, зазначених вище, пригнічення у 2-3 рази, порівняно з контролем, було виявлено при визначенні CV_{max} ($0,11 \pm 0,02$ мН/с при $0,38 \pm 0,09$ мН/с в контролі $p < 0,001$); RV_{max} ($0,07 \pm 0,02$ мН/с при $0,24 \pm 0,02$ мН/с в контролі, $p < 0,01$) та тривалості активного стану ($4,75 \pm 0,52$ с при $7,63 \pm 1,71$ с в контролі, $p < 0,01$) ЦВ матки дослідних тварин.

Аналогічна картина спостерігалась і при дослідженні параметрів скоротливої активності ОВ матки дослідних тварин. Так, було встановлено зменшення в середньому у 2-3 рази величин амплітуди скорочення до $0,41 \pm 0,12$ мН при $0,91 \pm 0,21$ мН в контролі, $p < 0,01$; ІС до $0,65 \pm 0,1$ мН при $1,46 \pm 0,38$ мН в контролі, $p < 0,01$ (рис. 2); CV_{max} до $0,11 \pm 0,03$ мН/с при $0,35 \pm 0,14$ мН/с в контролі, $p < 0,01$; RV_{max} до $0,07 \pm 0,02$ мН/с при $0,38 \pm 0,13$ мН/с в контролі ($p < 0,001$) та Т до $4,25 \pm 0,56$ с при $11,68 \pm 1,25$ с в контролі ($p < 0,01$).

Лише показник частоти скорочень (ЧС) міометрію матки дослідних тварин не змінювався і сягав значень, близьких до контролю (рис. 3).

При цьому слід відмітити, що відсутність достовірних змін цього параметру фіксувалась як у цервікальному, так і в оваріальному відділах матки дослідних тварин.

Таким чином, за результатами проведених досліджень було встановлено, що залізодефіцитний стан та розвиток залізодефіцитної анемії можуть відігравати первинну роль у формуванні патологій функціонального стану органів жіночої репродуктивної системи.

Висновки.

1. Встановлено, що тривалий дефіцит потрапляння заліза в організм, призводив до виражених патологічних змін функціонального стану органів жіночої репродуктивної системи дослідних тварин.

2. На фоні розвитку залізодефіцитної анемії у дослідних тварин виявлено значне зменшення

кількості ооцитів в яєчнику та погіршення якості таких ооцитів – спостерігалось виражене пригнічення мейотичного дозрівання виділених ооцитів як на стадії Метафази I, так і на стадії Метафази II, порівняно із цим показником у контрольних умовно-здорових тварин.

3. Хронічний дефіцит заліза призводив до пригнічення у 2-3 рази скоротливої активності міометрію матки дослідних тварин за п'ятьма з

шести досліджених параметрів як у цервікальному, так і в оваріальному відділах.

Перспективи подальших досліджень. В аспекті проведених досліджень актуальним є визначення характеру впливу експериментальних та існуючих комерційних протіанемічних препаратів на функціональний стан органів жіночої репродуктивної системи в умовах профілактики та лікування залізодефіцитної анемії.

Література

1. Безруков В. В. Вплив залізодефіцитної анемії вагітних на фізичний та психомоторний розвиток дітей раннього віку / В. В. Безруков // Буковинський медичний вісник. – 2002. – Т. 6, №2 – С. 135-137.
2. Городецкий В. В. Железодефицитные состояния и железодефицитная анемия: диагностика и лечение. Методические рекомендации / В. В. Городецкий, О. В. Годулян. – М. : Медпрактика-М, 2005. – 28 с.
3. Диагностика й профілактика дефіциту заліза і залізодефіцитної анемії у немовлят і дітей переддошкільного віку / Рекомендації Американської академії педіатрії (2010 р.) // «Дитячий лікар». – 2011. – № 1. – С. 60-68.
4. Коноводова Е. Н. Железодефицитные состояния в акушерско-гинекологической практике / Е. Н. Коноводова, Р. С. -Э. Докуева, Н. А. Якунина // РМЖ. – 2011. – № 20. – С. 1228-1231.
5. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др.; под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
6. Марушко Ю. В. Залізодефіцитні стани у дітей на сучасному етапі / Ю. В. Марушко, О. О. Лісоченко // Здоров'я України. – 2008. – № 10/1. – С. 25-27.
7. Стуклов Н. И. Анемии при заболеваниях женской репродуктивной системы / Н. И. Стуклов // Поликлиника. – 2014. – № 3. – С. 1-3.
8. Хашукоева А. З. Железодефицитные состояния при гинекологических заболеваниях и способы их коррекции / А. З. Хашукоева, С. А. Хлынова, М. В. Бурденко [и др.] // «Лечащий Врач». – 2014. – № 3. – URL: <http://www.lvrach.ru/2014/03/15435916>.
9. Anaemia in low-income and middle-income countries / Y. Balarajan, U. Ramakrishnan, E. Ozaltin [et al.] // Lancet. – 2011. – Vol. 378, № 9809. – P. 2123–2135.
10. Borel M. J. The impact of varying degrees of iron nutriture on several functional consequences of iron deficiency in rats // M. J. Borel, S. H. Smith, D. E. Brigham, J. L. Beard / J. Nutr. – 1991. – Vol. 121, № 5. – P. 729–736.
11. Crichton R. R. Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences / R. R. Crichton. – U. K. : John Wiley & Sons, Chichester, 2009. – 488 p.
12. Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study // A. Kamei, Y. Watanabe, T. Ishijima [et al.] // Physiol Genomics. – 2010. – Vol. 42, № 2. – P. 149–156.
13. Iron Deficiency Anemia. Assessment Prevention and Control. A Guide for Programme Managers. – Geneva : WHO, 2001. – 132 p.
14. Reeves P. G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet / P. G. Reeves, F. H. Nielsen, G. C. Fahey Jr. // J. Nutr. – 1993. – Vol. 123, № 11. – P. 1939–1951.
15. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia / Ed. by B. de Benoist, E. McLean, I. Egli and M. Cogswell. – 2008. – 48 p.

УДК 616. 155. 194. 8-056. 5: 616-06: 618. 11-008. 64: 618. 17

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ САМОК МИШЕЙ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЇ АНЕМІЇ

Литвиненко А. П., Резніченко Л. С., Дорошенко А. М., Блашків Т. В., Грузіна Т. Г.

Резюме. Експериментально досліджено функціональний стан органів репродуктивної системи самок мишей лінії BALB/c за умов моделювання залізодефіцитної анемії. Встановлено, що залізодефіцитний стан та розвиток залізодефіцитної анемії можуть відігравати первинну роль у формуванні патологічних змін функціонального стану органів жіночої репродуктивної системи.

Ключові слова: жіноча репродуктивна система, залізодефіцитна анемія, вплив, функціональний стан, патологія.

УДК 616. 155. 194. 8-056. 5: 616-06: 618. 11-008. 64: 618. 17

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМОК МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ

Литвиненко А. П., Резниченко Л. С., Дорошенко А. М., Блашков Т. В., Грузина Т. Г.

Резюме. Экспериментально изучено функциональное состояние органов репродуктивной системы самок мышей линии BALB/c в условиях моделирования железодефицитной анемии. Установлено, что железодефицитное состояние и развитие железодефицитной анемии могут играть первичную роль в формировании патологических изменений функционального состояния женской репродуктивной системы.

Ключевые слова: женская репродуктивная система, железодефицитная анемия, влияние, функциональное состояние, патология.

UDC 616. 155. 194. 8-056. 5: 616-06: 618. 11-008. 64: 618. 17

Functional State of Mice' Female Reproductive System under the Conditions of Iron Deficiency Anemia Modelling

Lytvynenko A. P., Rieznichenko L. S., Doroshenko A. M., Blashkiv T. V., Gruzina T. G.

Abstract. Despite of the intensive development and achievements of modern medicine, iron deficiency and iron deficiency anemia (IDA) remain one of the global challenges.

Women of reproductive age and pregnant women are one of the most vulnerable groups of iron deficiency. The main cause of iron deficiency anemia in women of reproductive age are considered bleedings with various etiologies, including significant uterine bleedings due course of various gynecological diseases.

However the question of the initial role of iron deficiency and iron deficiency anemia in the formation of pathologies of female reproductive system is still opened.

Estimation of the functional state of female reproductive system in the experimental animals under the conditions of iron deficiency anemia modeling was the main goal of this study.

The functional state of female reproductive system in the experimental animals under the conditions of iron deficiency anemia modeling has been studied using females of BALB/c mice.

According to the WHO data, chronic deficiency of iron entering into the organism is the most common cause of iron deficiency anemia under the absence of other associated pathologies. So, IDA of the experimental animals has been modelled using iron deficiency diet within two months.

It has been observed iron deficiency with initial signs of anemia in experimental animals as results of main blood parameters' analysis: hemoglobin concentration, red blood cell quantity and hematocrit.

At the same time, the marked pathological changes in the functional state of experimental animals' reproductive system have been revealed as for parameters of oocytes' quantity and their meiotic maturation as for studied parameters of the contractility of uterine myometrium.

Under the conditions of iron deficiency anemia modeling for experimental animals it has been revealed significant reduction in the number of oocytes in the ovary and deterioration of the quality for such oocytes. It has been observed marked inhibition of meiotic maturation of the isolated oocytes both as at Metaphase I and at Metaphase II in comparison with these indexes in control healthy animals.

Chronic iron deficiency was the cause of inhibition in the uterine myometrium contractility of experimental animals. 2-3 times inhibition has been observed for 5 from 6 investigated indexes, such as: amplitude of contractility (A, mH), the duration of the active state (T, sec), the rate of contractility (CVmax, mH/sec), the rate of relaxation (RVmax, mN/sec) and the index of contractility (IC mH). The high inhibition of such indexes has been shown both for cervical and ovarian parts of uterine myometrium.

The data of frequency of contractility for experimental animals' uterine myometrium have not changed in compare with control data for healthy animals. For experimental animals this parameter was on the control level both for cervical and ovarian parts of uterine myometrium.

Obtained experimental results show that iron deficiency and iron deficiency anemia play initial role in the formation of pathological changes in the functional state of the female reproductive system.

Keywords: female reproductive system, iron deficiency anemia, influence, functional state, pathology.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.

Стаття надійшла 19. 08. 2014 р.