

© Т. Ю. Вознесенська, О. М. Калейнікова, Т. В. Блашків, Т. М. Бризгіна, В. С. Сухіна, Р. І. Янчій

УДК 576. 8. 097. 5, 591. 465. 1, 615. 27

Т. Ю. Вознесенська, О. М. Калейнікова, Т. В. Блашків,

Т. М. Бризгіна, В. С. Сухіна, Р. І. Янчій

ФУНКЦІОНУВАННЯ ОРГАНІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ ЯЄЧНИКА У МИШЕЙ

Відділ імунології й цитотоксических сироваток Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця

НАН України (м. Київ)

Представлена робота виконана в 2009-2012 рр як частина планової теми відділу імунології й цитотоксических сироваток Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (м. Київ) «Вивчення механізмів розвитку імунноіндукованих запальних процесів в печінці і органах жіночої репродуктивної системи та шляхів їх корекції», № держ. реєстрації 0108U003914.

Вступ. Синдром передчасного виснаження яєчників охоплює гетерогенний спектр станів з фенотиповою мінливістю серед пацієнтів [4, 5]. Причинами даної патології називають генетичні відхилення [8] та циркулюючі антиоваріальні антитіла. Стверджується, що ризик появи синдрому передчасного виснаження яєчників, збільшується по двом основним відомим етіологіям: генетичною – «ломка Х» (у наявних повторюваних CGG в гені FMR1) і в асоціації з аутоімунною етіологією (численних відомих аутоімунних розладів) [6, 7]. Аутоімунна етіологія («імунологічний шум»), як свідчення неправильного функціонування імунної системи, мабуть, збільшує ризик розвитку передчасного виснаження яєчників у молодих жінок, що передбачає схильність до розвитку передчасного зменшення запасу ооцитів і часто проявляється як безпліддя. На сьогодні аутоімунне пошкодження яєчника представляється таким, що викликане зміною субпопуляцій Т-клітин і Т-cell-опосередкованим пошкодженням, збільшенням титру аутоантитіл, вироблених В-клітинами і низькою кількістю ефекторних супресорних/цитотоксических лімфоцитів, а також зменшенням кількості та активності звичайних клітин-кілерів [8].

Оскільки точні причини аутоімунної патології яєчників залишаються невідомими в більшості випадків, а кількість жінок з передчасним виснаженням яєчників і з аутоімунним оофоритом у всьому світі збільшується, актуальними стають дослідження на моделях з використанням тварин, що розкривають як можливу етіологію аутоімунних патологій, так і механізми їх супресії.

Мета дослідження полягала в оцінці функціонування органів репродуктивної системи (яєчників, яйцеводів, матки) та розвитку ембріонів в умовах експериментального імунного ушкодження яєчників у мишей. Досягнення мети вимагало вирішення таких **завдань**: 1) встановити кількість ооцитів, які

виділялися з одного яєчника, відновлювали мейоз і формували полярне тільце *in vitro*, а також оцінити їх апоптотичний фенотип, за допомогою розподілу пропідіума йодиду в ооцитах; 2) з використанням методу фазно-графічного аналізу дослідити скоротливість яйцеводів і міометрію у мишей на кінець імунізації і на 5, 12, 19, 25, 50 і 56 дні після імунізації, а саме оцінити зміну величин амплітуди скорочення, тривалості розслаблення, частоти скорочення, тривалості скорочення, швидкості скорочення і розслаблення, індекс скоротливості (IC); 3) дослідити морфологічні особливості предімплантаційних ембріонів на 5-й день гестації експериментальних самок (19 і 50 день після імунізації) і постімплантаційних ембріонів на 10-11 день гестації (25 і 56 день після імунізації).

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведені на самках мишей лінії СВА (віком 8 тижнів, вагою 16-18 г) з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Імунізацію антигеном алогенного яєчника здійснювали чотириохратно: перша ін'єкція підшкірно екстрактом яєчників білих лабораторних мишей (2 мг білка на мишу масою 20 г) у повному ад'юванті Фрейнда, через 7 діб тварин імунізували антигеном внутрішньовенне в дозі (0,5; 0,75; 1,0 мг) білка на мишу через дві доби на третю. Через 1, 5, 12, 19, 25, 50 і 56 добу після останнього введення антигену тварин присипляли ефіром та забирали яєчники, яйцеводи і матку для подальших досліджень. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин. Спарювання самок контрольних і експериментальних груп з інтактними самцями, а також всі маніпуляції із ембріонами проводили за [1]. Яйцеводи разом з маткою забирали цілком і поміщали в 4°С розчин Кребса такого складу (в мілімолях на 1 літр): NaCl – 120, KCl – 5,9, NaHCO₃ – 15,5, NaH₂PO₄ – 1,2, MgCl₂ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, глюкози – 11,5. Для ізометричної реєстрації сили, ізольовані яйцеводи (цілком, довжина приблизно 8-10 мм) та смужки міометрію (приблизно 1: 1: 8 мм, вздовж) поміщали в камеру для перфузії, яка містила розчин Кребса (37°С, рН 7. 4). Ізометрична сила скорочень вимірювалась механо-електричним перетворювачем (FT 106) і реєструвалась швидкодіючим самописцем Н3021-3. Візуальний контроль досліджуваних

параметрів здійснювали за допомогою осцилографа С1-83. Рівномірну перфузію розчину здійснювали перистальтичним насом НП-1М. Здійснювали термостатування розчинів і в цілому експериментальної плексигласової камери U2. Зразки, не здатні скорочуватись спонтанно протягом 20-25 хв впрацювання, були виключені. Зареєстровані скорочення піддавалися статистичному аналізу програми Origin 8Pro (США).

Результати досліджень та їх обговорення. Раніше показано, що на 4-5 день гестації спостерігали зменшення, а на 10-11 день гестації – збільшення індексу скоротливості [2], а також вивчали особливості скоротливої активності яйцепроводів і міометрію та показники пре-і постімплантаційної смертності ембріонів у мишей з експериментальним імунним ушкодженням яєчників [3].

В цій роботі нами отримано нові дані про те, що імунізація мишей тканиною аlogenних яєчників призводила до зменшення кількості ооцитів у яєчнику, до появи апоптотичного фенотипу і пригніченню мейотичного дозрівання ооцитів. На 5 день після імунізації нами встановлено апоптотичний фенотип ооцитів, а саме в забарвлених пропідіумом йодидом клітинах, ядра представлені як тільця ущільненого хроматину і це відрізняється від розсіяної диско-подібної морфології хроматину ядер клітин в контрольних ооцитах, а також в клітинах від мишей на 19 і 50 день після імунізації.

Вперше спостерігалось: зниження ІС яйцеводів і міометрію на 12 день після закінчення імунізації у порівнянні з відповідними величинами у тварин на кінець імунізації; ми не виявили вірогідних відмінностей на 5-й день після імунізації між величинами скоротливості яйцеводів і міометрію в порівнянні з такими в контрольних тварин і такими на кінець імунізації; вірогідно не змінювались частота скорочення, тривалість скорочення і розслаблення яйцеводів і міометрію; на 19 день після імунізації (4-5 день гестації) спостерігали зростання ІС яйцеводів і міометрію; на 50 день після імунізації (4-5 день гестації) встановлено зменшення ІС яйцеводів і міометрію, тобто, показники скоротливої активності поверталися до контрольних величин; на 25 день після імунізації (10-11 день гестації) спостерігали зменшення ІС яйцеводів і міометрію; параметри скоротливої

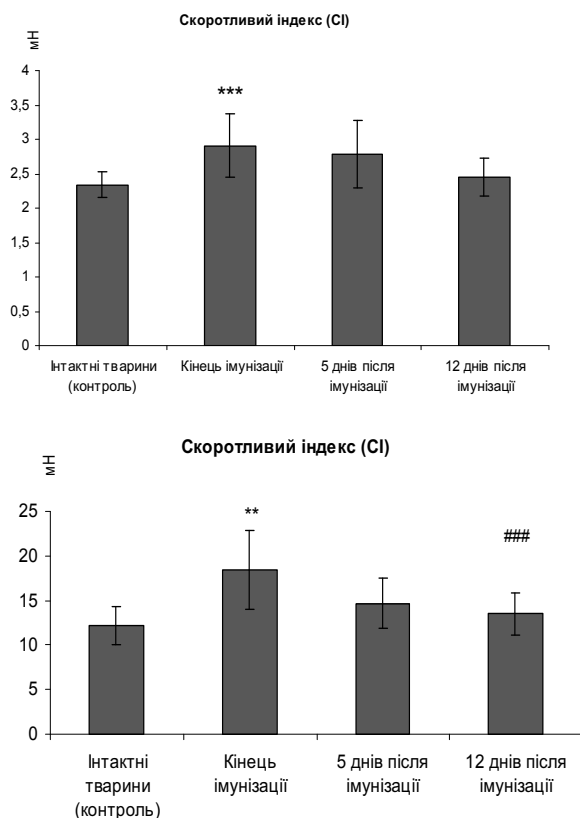


Рис. Вплив імунізації антигеном аlogenного яєчника на індекс скоротливості яйцеводів і міометрію у мишей.

Примітка: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,05$ – вірогідність відносно інтактних тварин; ### – $p < 0,05$ – вірогідність відносно тварин на кінець імунізації.

активності яйцеводів і міометрію на 56 день після імунізації (10-11 день гестації) вірогідно не відрізнялися від контрольних величин (**рис.**).

Вивчення ембріональної загибелі показало, що у самок дослідних груп (19 день і 50 день) при схрещуванні їх з інтактними самцями спостерігалось збільшення (19 день) пре- і постімплантаційної загибелі ембріонів, а самки, які були запліднені протягом перших 5 -12 днів після імунізації, виявилися невагітними.

Вивчення морфологічних особливостей предімплантаційних ембріонів на 5-й день вагітності експериментальних самок (19 день і 50 день після імунізації) показало, що відбувається вповільнення ембріонального розвитку на стадії компактизації (19 день) і формування бластоцелю (50 день) (**табл. 1**).

Таблиця 1

Розвиток преімплантаційних ембріонів миші в умовах експериментального імунного ушкодження яєчників на 4-5 день гестації

Дні після імунізації	Кількість ембріонів	Кількість і % ембріонів на стадії розвитку			
		Дроблення від 2 до 8 кл	Компактизації >8кл	Ділення 16 кл	Формування бластоцелю 32 кл
інтактні тварини	15	0/0	0/0	4/26,7	11/73,3
19	17	10*/58,8	7*/41,2	0*/0	0*/0
50	22	7*/31,8	12*/54,6	3*/13,6	0*/0

Примітка: * – $p < 0,01$ - вірогідність відносно інтактних самок; другі цифри %.

Таблиця 2

Розвиток постімплантаційних ембріонів миші в умовах експериментального імунного ушкодження яєчників на 10-11 день гестації

Дні після імунізації	Кількість ембріонів	Кількість і % ембріонів на стадії розвитку			
		циліндрична форма з чіткою границею між зародковою і позазародковою областями (6-й день)	формування первинної смужки (7-й день)	утворення амніона; розширення амніотичної порожнини (8-й день)	серце скорочується кровообіг в вісцеральному жовтковому мішку (9 день)
Інтактні тварини	17	0/0	0/0	8/47,1	9/52,9
25	15	8*/53,3	7*/46,7	0*/0	0*/0
56	21	1*/4,8	12*/57,1	8*/38,1	0*/0

Примітка: * – $p < 0,01$ - вірогідність відносно інтактних самок; другі цифри %.

Вивчення морфологічних особливостей постімплантаційних ембріонів показало вповільнення ембріонального розвитку в ході гастрюляції – на стадії формування первинної смужки (25 день) і утворення амніону (56 день) (**табл. 2**).

Отже, ми вважаємо, що імунізація мишей антигеном алогенного яєчника спричиняє розвиток синдрому системної реакції на запалення і виникнення поліорганної дисфункції, що проявляється у розладі оогенезу, скоротливості яйцеводів та матки, а також призводить до порушення нормального розвитку ембріонів.

Відомо, що синдром системної відповіді на запалення – це сигнал про надлишкову продукцію цитокінів надмірно активованими макрофагами та іншими цитокін-продукуючими клітинами – це початок розвитку патологічного процесу, що є відображенням недостатньо контрольованої імунною системою, секреції цитокінів та інших медіаторів запалення, внаслідок розладу міжклітинних взаємин у відповідь на важкі антигенні стимули як бактеріального, так і не бактеріального походження. Синдром системної реакції на запалення може існувати протягом

тривалого часу, до зменшення вмісту цитокінів та монооксиду азоту в крові, до відновлення балансу між прозапальними і протизапальними цитокінами, а саме до моменту відновлення функції імунної системи контролювати продукцію цитокінів. Знання патогенезу синдрому системної реакції на запалення дозволить розробляти антицітокінову терапію для профілактики та лікування аутоімунних ускладнень. Для цих цілей можна застосовувати моноклональні антитіла проти найбільш активних прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, фактора некрозу пухлини).

Висновки. Імунізація мишей антигеном алогенного яєчника спричиняє розлади у мейотичному дозріванні ооцитів, скоротливості яйцеводів та міометрію, пригнічує розвиток ембріонів і може використовуватися у якості експериментальної моделі передчасного виснаження яєчників у молодих жінок з аутоімунною патологією.

Перспективою подальших досліджень на моделях з використанням тварин може бути з'ясування молекулярно-генетичних механізмів розвитку дисфункції ооцитів за умов синдрому системної реакції на запалення у жінок.

Література

1. Манк А. Биология развития млекопитающих. Методы / А. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
2. Сердюк О. М. Фазно-графічний аналіз скоротливості міометрію миші в умовах гестації / О. М. Сердюк, Ю. П. Бідзіля, Р. І. Янчій // Перспективи медицини і біології. – 2010. – № 2. – С. 34-39.
3. Сердюк О. Н. Экспериментальное иммунное поражение яичников: особенности сократительной активности яйцеводов и миометрия, пре- и постимплантационная смертность эмбрионов у мышей / О. Н. Сердюк, Ю. П. Бидзиля, Р. И. Янчий. // Проблемы репродукции. – 2010. – № 3. – С. 19-23.
4. Bachelot A. Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure / A. Bachelot, A. Rouxel, N. Massin, [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2009. – Vol. 161(1). – P. 179-187.
5. Gleicher N. Do etiologies of premature ovarian aging (POA) mimic those of premature ovarian failure (POF)? / N. Gleicher, A. Weghofer, K. Oktay [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24(10). – P. 2395-2400.
6. Gleicher N. Is the immunological noise of abnormal autoimmunity an independent risk factor for premature ovarian aging? / N. Gleicher, A. Weghofer, K. Oktay [et al.] // Menopause. – 2009. – Vol. 16(4). – P. 760-764.
7. Tsigkou A. High serum inhibin concentration discriminates autoimmune oophoritis from other forms of primary ovarian insufficiency / A. Tsigkou, S. Marzotti, L. Borges [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 93(4). – P. 1263-1269.
8. Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure / S. Vujovic // Menopause Int. – 2009. – Vol. 15(2). – P. 72-75.

УДК 576. 8. 097. 5, 591. 465. 1, 615. 27

ФУНКЦІОНУВАННЯ ОРГАНІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ ЯЄЧНИКА У МИШЕЙ

Вознесенська Т. Ю., Калейнікова О. М., Блашків Т. В., Бризгіна Т. М., Сухіна В. С., Янчій Р. І.

Резюме. Досліджували функціонування органів репродуктивної системи в умовах експериментального імунного ушкодження яєчників. Встановлено, що імунізація мишей антигеном алогенного яєчника спричиняє розлади у мейотичному дозріванні ооцитів, скоротливості яйцеводів та міометрію, пригнічує розвиток ембріонів і може використовуватися у якості експериментальної моделі передчасного виснаження яєчників у молодих жінок з аутоімунною патологією. Вважаємо, що імунізація мишей антигеном алогенного яєчника спричиняє розвиток синдрому системної реакції на запалення і виникнення поліорганної дисфункції, що призводить до порушення нормального функціонування органів репродуктивної системи.

Ключові слова: синдром передчасного виснаження яєчників.

УДК 576. 8. 097. 5, 591. 465. 1, 615. 27

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИМУННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЯИЧНИКОВ

Вознесенская Т. Ю., Калейникова О. Н., Блашків Т. В., Брызгина Т. М., Сухина В. С., Янчий Р. И.

Резюме. Исследовали функциональное состояние органов репродуктивной системы в условиях экспериментального иммунного повреждения яичников. Показано, что иммунизация мышей антигеном аллогенного яичника приводит к нарушению мейотического созревания ооцитов, изменению сократительной активности яйцеводов и матки, задержки развития эмбрионов и может использоваться в качестве экспериментальной модели преждевременного истощения яичников у молодых женщин с аутоиммунной патологией. Считаем, что иммунизация мышей антигеном аллогенного яичника вызывает развитие синдрома системной реакции на воспаление и возникновение полиорганной дисфункции, что приводит к нарушению нормального функционирования органов репродуктивной системы.

Ключевые слова: синдром преждевременного истощения яичников.

UDC 576. 8. 097. 5, 591. 465. 1, 615. 27

Reproductive System Organs Functioning in Conditions of Experimental Immune Ovarian Failure

Voznesenska T. Yu., Kalejnikova O. M., Blashkiv T. B., Bruzgina T. M., Suhina V. S., Yanchiy R. I.

Summary. In this paper, we obtained new data that immunization of mice allogeneic ovarian tissue resulted in a decrease in the number of oocytes in the ovary before the apoptotic phenotype and depression oocyte meiotic maturation. In assessing the oocytes 5 days after immunization we have set in their apoptotic phenotype, namely propidium iodide stained cells, nuclei are represented as cells compacted chromatin and is different from the scattered disco-like morphology of chromatin nuclei of cells in control oocytes and oocytes from mice at 19 and 50 days after immunization.

First observed: decrease contractivity index (IC) of the oviduct and myometrium on day 12 after immunization compared with the corresponding values in animals at the end of immunization, we found no probable differences in day 5 after immunization between values oviduct and myometrium contractility compared with those in control animals and so at the end of immunization, did not change significantly decrease the frequency, duration of contraction and relaxation, W50 oviduct and biometrics, on day 19 after immunization (4-5 days of gestation) observed the growth of IP oviduct and myometrium, and on day 50 after immunization (4-5 day of gestation) is set to decrease in IC oviduct and myometrium, ie, indices of contractile activity returned to control values, on day 25 after immunization (10-11 days of gestation) observed a decrease in IC oviduct and myometrics; parameters of contractile activity of the oviduct and myometrium on day 57 after immunization (10-11 days gestation) did not differ significantly from control values.

Study of fetal death presented new evidence that females in the study groups (19 days and 50 days) when crossed them with intact males, an increase (19 day) pre-and postimplantation destruction of embryos, females that were fertilized during the first 5 days and 12 days after immunization, were not pregnant. The study of morphological features preimplantation embryos to 5-th day gestation experimental females (19 days and 50 days after immunization) showed that embryonic development is slowing down under compaction (19 day) and blastocist formation (50 days).

The study of morphological features postimplantation embryos showed slowing of embryonic development during gastrulation – at the stage of initial strip (25 days) and the formation of the amnion (56 days). We believe that immunization of mice allogeneic antigen ovary syndrome causes a systemic response to inflammation and the occurrence of multiple organ dysfunction, as manifested in the disorder oogenesis, oviduct and uterine contractility and leads to disruption of the normal development of embryos and therefore can serve as a model of premature failure ovaries and premature aging of the ovary in young women in association with autoimmune etiology (autoimmune incorrect function “immunological noise”).

Key words: premature ovarian failure.

Рецензент – проф. Громова А. М.

Стаття надійшла 11. 04. 2012 р.