

УДК: 618.11-002.2-092.4

Н. О. Волкова, М. С. Юхта, Т. О. Юрчук, Л. В. Степанюк, О. Д. Иванова, О. В. Павлович

Моделювання хронічного запалення яєчників

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Ключові слова: *оофорит, яєчники, фолікул, лейкоцити.*

Збереження репродуктивного здоров'я населення – високопріоритетний напрям сучасної медицини. У багатьох випадках причиною порушення репродуктивної функції у жінок є хронічні запалення органів малого тазу. Для дослідження можливості застосування інактивованої вакцини *Staphylococcus aureus* штам 209 для моделювання хронічного запалення яєчників використали 25 непородистих статевозрілих білих мишей-самок. У виведених із досліду тварин у контрольні строки експерименту (7, 14, 21 та 31 доба) візуально оцінювали стан органів черевної порожнини та забирали придатки матки із прилеглими пасмами сальника. Для визначення морфологічних змін в яєчниках виготовляли гістологічні препарати, котрі забарвлювали гематоксилином та еозином. Показано, що внутрішньочеревинне введення інактивованої вакцини *Staphylococcus aureus* штам 209 на 21 добу призводило до формування хронічного продуктивного запалення в яєчниках мишей. Це свідчить про перспективність цієї моделі хронічного запалення яєчників для дослідження ефективності різних методів лікування цієї патології, у тому числі клітинної терапії.

Моделирование хронического воспаления яичников

Н. А. Волкова, М. С. Юхта, Т. А. Юрчук, Л. В. Степанюк, Е. Д. Иванова, Е. В. Павлович

Сохранение репродуктивного здоровья населения – высокоприоритетное направление современной медицины. Во многих случаях причиной нарушения репродуктивной функции у женщин являются хронические воспаления органов малого таза. С целью исследования возможности использования инактивированной вакцины *Staphylococcus aureus* штам 209 для моделирования хронического воспаления яичников использовали 25 беспородных половозрелых белых мышей-самок. У выведенных из опыта животных в контрольные сроки эксперимента (7, 14, 21 и 31 сутки) визуально оценивали состояние органов брюшной полости и забирали придатки матки с прилежащими прядями сальника. Для определения морфологических изменений в яичниках изготавливали гистологические препараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Показано, что внутрибрюшинное введение инактивированной вакцины *Staphylococcus aureus* штам 209 на 21 сутки приводило к формированию хронического продуктивного воспаления в яичниках мышей. Это свидетельствует о перспективности этой модели хронического воспаления яичников для исследования эффективности разных методов лечения этой патологии, в том числе клеточной терапии.

Ключевые слова: *оофорит, яичники, фолликул, лейкоциты.***Патология.** – 2014. – №1 (30). – С. 100–104**Modeling of chronic ovary inflammation**

N. O. Volkova, M. S. Yuhta, T. O. Yurchuk, L. V. Stepanuk, O. D. Ivanova, O. V. Pavlovich

Aims. To investigate the ability of using the inactivated vaccine of *Staphylococcus aureus* strain 209 for modeling of chronic inflammation of the ovaries in laboratory mice.

Materials and methods. 25 mature outbred white female mice weighing 18–20 g were used as experimental animals with one-fold intraperitoneal injection of inactivated *Staphylococcus aureus* strain 209 vaccine in the dose of 50x10⁶ microbial bodies in 0,3 ml of physiological solution.

Results. Histologically the dominance of atresia over the follicle growth with the development of sclerotic changes and their total number reducing was observed on the 21st day of the experiment. At the early terms in the blood of experimental animals leukocytosis was monitored, and, beginning from the 14th day, inflammation acquired signs of chronic, manifested in decreasing of leukocyte number without normalization of this parameter until the end of the experiment.

Conclusion. Intraperitoneal injection of inactivated vaccine of *Staphylococcus aureus* strain 209 on the 21st day led to the formation of chronic productive inflammation in mice ovaries.

Key words: *oophoritis, ovaries, ovarian follicle, leukocytes.***Pathologia.** 2014; №1 (30): 100–104

В Україні збереження репродуктивного здоров'я населення є високопріоритетним напрямом сучасної медицини. У багатьох випадках головною причиною порушення репродуктивної функції у жінок є хронічні запалення органів малого тазу, частота яких за останні роки не мала тенденції до зниження. За даними МОЗ України, частота запальних захворювань органів малого тазу становить 60–65% у структурі гінекологічної патології; як наслідок, у 60% випадків діагностують безпліддя на тлі дисфункції яєчників [2].

Хронічне запалення яєчників із сучасних позицій є спочатку ексудативним, а потім проліферативним процесом, що призводить до змін у гормональному гомеостазі з порушенням процесів дозрівання фолікулів, овуляції та формування жовтого тіла.

Експериментальні моделі запалення можна використовувати як для оцінки впливу різних етіологічних факторів, так і для дослідження ефективності його лікування. З останньою метою на скринінговому етапі дослідження рекомендується використовувати карагінан (із флогоге-

нів асептичної природи) [6] або стафілокок (із мікробної флори) [7]. Однак необхідно зазначити, що в клінічній практиці набагато частіше спостерігають не гранульоматозні, а запальні процеси придатків матки, що викликані флогогенними агентами мікробного походження. Вибір інактивованої вакцини *Staphylococcus aureus* як флогогену зумовлений також тим, що етіологічна роль аеробної інфекції, зокрема золотистого стафілокока, в гінекологічній патології залишається провідною.

Мета роботи

Дослідження можливості застосування інактивованої вакцини *Staphylococcus aureus* штам 209 для моделювання хронічного запалення яєчників у лабораторних мишей.

Матеріали і методи дослідження

Як експериментальних тварин використали 25 непородистих статевозрілих білих мишей-самок із масою тіла 18–20 г, із них сформували групи: 1) контрольна (n=5) – тварини без будь-яких втручань; 2) експериментальна (n=20) – тварини, яким за допомогою інсулінового шприца одноразово внутрішньочеревинно вводили інактивовану вакцину *Staphylococcus aureus* штам 209 у дозі 50×10^6 мікробних тіл у 0,3 мл фізіологічного розчину. Вакцину отримували з добової культури стафілокока шляхом її інкубації при температурі 75°C протягом 1 години. Усі тварини у процесі дослідження перебували в умовах віварію на звичайному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі і води.

У тварин, котрі були виведені з досліду, в контрольні строки експерименту (7, 14, 21 та 31 доба) візуально оцінювали стан органів черевної порожнини та забирали придатки матки із прилеглими пасмами сальника. Для визначення морфологічних змін в яєчниках виготовляли гістологічні препарати, які забарвлювали гематоксиліном та еозинном. Стадії розвитку фолікулів ідентифікували згідно з модифікованою класифікацією Gougeon [4].

Крім того, у відповідні строки із хвостової вени тварин контрольної та експериментальної груп отримували периферичну кров і визначали загальну кількість лейкоцитів за стандартним методом [1].

Усі маніпуляції із тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин [3]. Протягом статистичного опрацювання результатів застосовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента з використанням програми Excel.

Результати та їх обговорення

Під час спостереження за тваринами контрольної та експериментальної груп протягом 31 доби не виявили змін у поведінці.

У групі інтактних тварин яєчники за формою та гістологічною будовою відповідали нормі для статевозрілих мишей без ознак запальних змін. Поверхня яєчників була вкрита одношаровим кубічним епітелієм, під яким розташовувалась сполучнотканинна білкова оболонка. Фолікулярна структура яєчників представлена примордіальними, первинними, преантральними й антральними

фолікулами, що розділені незначними прошарками стромальної тканини. Середовище преовуляторних фолікулів гомогенне, яйцеклітини без ознак дегенерації рівномірно оточені клітинами гранульози. По периферії зрізів визначались поодинокі атретичні фолікули та жовті тіла з характерною для них структурою (рис. 1а).

На 7 добу в яєчниках експериментальних тварин із введенням інактивованої вакцини відзначали набряк і поширені крововиливи, при цьому структура органа була крихкою. Гістологічне дослідження засвідчило: в поверхневому шарі яєчників визначалась лейкоцитарна інфільтрація. Пул фолікулів у яєчниках на цьому терміні спостереження зберігався (рис. 1б). Поряд із примордіальними і первинними фолікулами наявні одиничні преантральні та антральні фолікули з чітко визначеною яйцеклітиною. Середовище преовуляторних фолікулів гомогенне, клітини гранульози рівномірно вистилали фолікул, але в деяких примордіальних фолікулах визначали незначні дистрофічні зміни клітин гранульози. Атрезія деяких фолікулів завершувалась заростанням їхніх порожнин клітинами сполучної тканини. Судини мозкового шару були нерівномірно розширені з ознаками тромбозу та крововиливів.

На 14 добу дослідження відзначали зменшення розміру яєчників і наявність поодиноких крововиливів. Відзначено тенденцію до зменшення гіперемії та лімфоцитарної інфільтрації. У кірковому шарі яєчників фолікули розташовувались по краю та були представлені переважно атретичними формами (рис. 1в). Слід відзначити, що атрезія перебігала за типом продуктивного процесу з формуванням багат шарової гранульозної оболонки. Кількість примордіальних і первинних фолікулів значно зменшувалась щодо інтактних тварин. Гемодинамічні розлади проявлялись стазом формених елементів крові та периваскулярною лейкоцитарною інфільтрацією.

На 21 добу відбувалась хронізація запального процесу, що супроводжувалось подальшим зменшенням розміру яєчників і відсутністю крововиливів у більшості випадків. У кірковій речовині яєчників фолікули, що розвивались, майже не траплялись (рис. 1г). Натомість встановили значну кількість атретичних фолікулів із дезорганізованим епітелієм і міграцією макрофагів у їхню порожнину (рис. 1д). Ооцит (при його наявності в таких фолікулах) був частково стиснутий із пікнотичним ядром, іноді оточений дезорганізованими, набряклими фолікулярними клітинами. Під базальною мембраною фолікулів, між генеративними елементами та в мозковому шарі яєчників, визначено розростання сполучної тканини.

На 31 добу дослідження макроскопічно встановили зменшення розміру яєчників. У гістологічних зрізах, що отримані на 31 добу моделювання, по периферії розташовувались атретичні фолікули з ознаками дистрофії. Їхня форма була порушена, шари клітин гранульози втрачали впорядковану структуру (рис. 1е). При цьому в деяких випадках спостерігали деформовані фолікули з дезорганізацією клітин гранульози, що проявлялось у

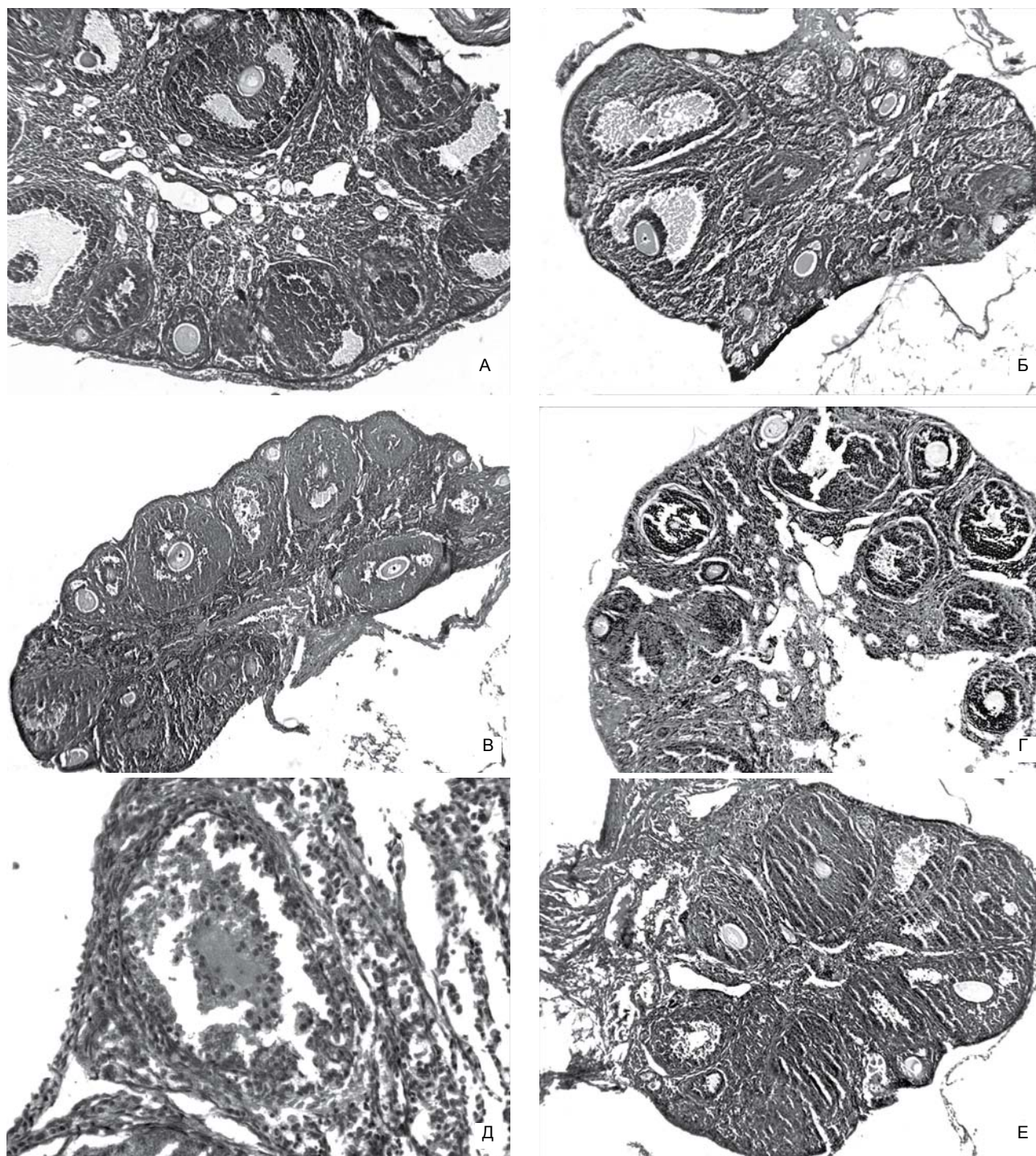


Рис. 1. Мікрофотографії гістологічних зрізів яєчників інтактної (А) та експериментальної групи тварин 7 доба (Б), 14 доба (В), 21 доба (Г), 31 доба (Д). Світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилином і еозином, зб. $\times 250$.

збільшенні міжклітинного простору та акумуляції рідини між клітинами. Під базальною мембраною фолікулів виявили розростання сполучнотканинних елементів. Мозковий шар характеризувався незначною лейкоцитарною інфільтрацією.

Кількість лейкоцитів периферичної крові протягом перших 14 діб після введення вакцини збільшувалась у 3,2 раза (рис. 2). Однак на 21 добу цей показник був в 1,75 раза нижчим щодо попереднього строку ($P < 0,05$). Надалі рівень лейкоцитів статистично значущо ($P < 0,05$)

не змінювався, але й не досягав значень інтактних тварин ($P < 0,05$), що свідчило про зменшення гостроти запального процесу.

Відомо, що збільшення кількості лейкоцитів периферичної крові – одна із типових ознак наявності в організмі осередку запалення, а рівень підвищення цього показника прямо залежить від інтенсивності запального процесу. При цьому для хронічного запалення характерне відносно незначне, але стійке підвищення кількості лейкоцитів. Виходячи з динаміки кількості лейкоцитів

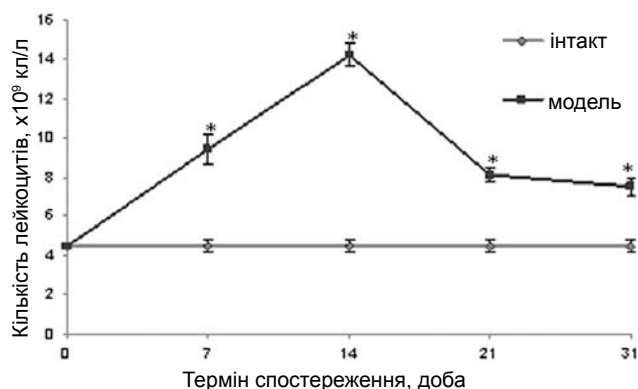


Рис. 2. Динаміка кількості лейкоцитів периферичної крові піддослідних тварин.

Примітка: * – різниця статистично значуща відносно інтактних тварин ($P < 0,05$; $n=5$).

периферичної крові експериментальних тварин, введення стафілококової вакцини призвело до розвитку гострого запального процесу, що на 21 добу набував хронічного характеру.

Одночасно із хронізацією запального процесу виявили статистично значуще ($P < 0,05$) зниження числа фолікулів (рис. 3), що, певно, було зумовлене посиленням процесів атрезії. В результаті прогресування останніх на 31 добу з моменту введення вакцини кількість фолікулів у препаратах знижувалась в 1,7 раза ($10,55 \pm 2,48$) щодо показника інтактних тварин ($18,25 \pm 4,52$).

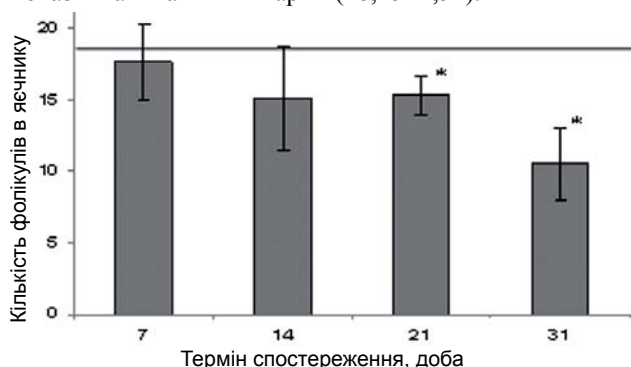


Рис. 3. Динаміка кількості фолікулів у яєчниках піддослідних тварин.

Примітка: суцільна лінія – показник інтактних щурів, * – різниця статистично значуща відносно інтактних тварин ($P < 0,05$; $n=5$).

Список літератури

1. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / [под ред. В.В. Меньшикова]. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
2. Медико-демографічна ситуація та організація медичної допомоги населенню у 2010 році: підсумки діяльності системи охорони здоров'я та реалізація Програми економічних реформ на 2010–2014 роки «Заможне суспільство, конкурентоспроможна економіка, ефективна держава». – К. : МОЗ України, 2011. – 104 с.
3. Council of Europe [France]. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 18.III.1986. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.
4. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results / A. Gougeon // Hum. Reprod. – 1986. – № 1. – P. 81–87.
5. Hang R.W. Management of anovulatory infertility / R.W. Hang, E.Y. Hung // Best practice and research. Clinical obstetrics and gynaecology. – 2012. – Vol. 26. – № 6. – P. 757–768.
6. Patil R.B. Effect of sesbania grandiflora and sesbania sesban bark on carrageenan induced acute inflammation and adjuvant-induced arthritis in rats / R.B. Patil, B.K. Nanjwade, F.V. Manvi // Pharma science monitor. – 2010. – Vol. 1. – № 1. – P. 75–89.
7. Wang J.E. Peptidoglycan of Staphylococcus aureus causes inflammation and organ injury in the rat / [J.E. Wang, M.K. Dahle, A.M. Yndestad et al.] // Critical Care Medicine. – 2004. – Vol. 32. – № 2. – P. 546–552.
8. Zhang X. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats / [X. Zhang, C. Zhang, S. Shen et al.] // Human Reproduction. – 2013. – Vol. 28. – № 11. – P. 3074–3085.

Наявність запального осередку чинить істотний вплив на фолікулогенез [5]. На тлі хронічного оофориту може відбуватись втрата фолікулярних структур із переходом у фіброз [8]. Слід відзначити, що описані в роботі морфологічні зміни в яєчниках мишей після введення інактивованої стафілококової вакцини також свідчать про розвиток у них виражених запальних процесів, котрі можуть призвести до зниження репродуктивної функції. Так, у яєчниках експериментальних тварин процеси атрезії переважали над ростом фолікулів, що зрештою призводило до зменшення їхньої середньої кількості та розвитку склеротичних змін. З огляду на гістологічні дані, фолікули, що залишались, не могли забезпечити нормальну репродуктивну функцію.

Аналізуючи наведені експериментальні результати, можна зробити висновок: одноразове внутрішньочеревинне введення інактивованої вакцини Staphylococcus aureus штам 209 на 21 добу експерименту призводить до формування хронічного продуктивного запалення в яєчниках мишей, що за морфологічними й лабораторними критеріями відповідає хронічному запаленню в жінок.

Висновки

Внутрішньочеревинне введення інактивованої вакцини Staphylococcus aureus штам 209 призводить до формування хронічного запалення яєчників у лабораторних мишей на 21 добу.

Лейкоцитоз, зумовлений введенням стафілококової вакцини, характеризується двома чітко вираженими фазами: «гострою», з наростанням кількості лейкоцитів периферичної крові протягом перших 14 діб спостереження, та «хронічною», зі зниженням цього показника на 21 добу без його нормалізації до кінця експерименту.

Гістологічний аналіз свідчить про перевагу процесів атрезії фолікулів над їх ростом, що врешті призводить до зменшення їхньої середньої кількості та розвитку склеротичних змін в яєчниках тварин із введенням стафілококової вакцини.

Наведена модель хронічного запалення яєчників є перспективною для дослідження ефективності різних методів лікування цієї патології, у тому числі клітинної терапії.

References

1. Menshikova, V. V. (1987) *Laboratornye metody issledovaniya v klinike [Laboratory methods of investigation in the clinic]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
 2. (2011) *Medyko-demografichna sytuatsiia ta organizatsiia medychnoi dopomogy naselenniu u 2010 rotsi : pidsumky diialnosti systemy okhorony zdorovia ta realizatsiia Programy ekonomichnykh reform na 2010-2014 roky «Zamozhne suspilstvo, konkurentospromozhna ekonomika, efektyvna derzhava» [Medico-demographic situation and organization of medical assistance to the population in 2010 year : results of activity of the health system and the implementation of an economic reform Program for 2010-2014 years «Rich society, competitive economy, effective government»]*. Kiev: MOZ Ukrainy. [in Ukrainian].
 3. Council of Europe [France]. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 18.III.1986. Retrieved from <http://conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.
 4. Gougeon, A. (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum. Reprod.*, 1, 81–87.
 5. Hang, R. W. & Hung, E. Y. (2012) Management of anovulatory infertility. *Best practice and research. Clinical obstetrics and gynaecology*, 26(6), 757–768.
 6. Patil, R. B., Nanjwade, B. K. & Manvi, F. V. (2010) Effect of sesbania grandiflora and sesbania sesbanbark on carrageenan induced acute inflammation and adjuvant-induced arthritis in rats. *Pharma science monitor*, 1(1), 75–89.
 7. Wang, J. E., Aasen, A. O., Bauer, M., Foster, S. J., Aukrust, P., Mcdonald, M. C., et al. (2004). Peptidoglycan of Staphylococcus aureus causes inflammation and organ injury in the rat. *Critical Care Medicine*, 32(2), 546–552.
 8. Zhang, X., Zhang, C., Shen, S., Xia, Y. J., Yi, L., Gao, Q., et al. (2013). Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Human Reproduction*, 28(11), 3074–3085.
-

Відомості про авторів:

Волкова Н.О., к. біол. н., ст. наук. співробітник, зав. лабораторії біотехнології і прикладних нанотехнологій відділу кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, E-mail: volkovanatali2006@yandex.ua.

Юхта М.С., науковий співробітник відділу кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Юрчук Т.О., мол. науковий співробітник відділу кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Степанюк Л.В., мол. науковий співробітник лабораторії біотехнології і прикладних нанотехнологій відділу кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Іванова О.Д., лаборант лабораторії біотехнології і прикладних нанотехнологій відділу кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Павлович О.В., ст. науковий співробітник відділу кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Надійшла в редакцію 20.03.2014 р.