

Влияние криоэкстракта плаценты на индукцию суперовуляции у лабораторных мышей с хроническим воспалением яичников

UDC 57.043:611.013.85:616-002.2:612.621.9

N.G. GRISCHENKO¹, V.I. GRISCHENKO²,

Ye.I. SMOLYANINOVA^{2*}, L.G. CHERNYSHENKO², N.A. VOLKOVA²

Effect of Placental Cryoextract on Superovulation Induction in Mice with Chronic Ovary Inflammation

Исследовано влияние препарата "Криоцелл-криоэкстракт плаценты" (КП) на индукцию суперовуляции у лабораторных мышей при реактивном хроническом воспалении яичников. Показано, что хроническое воспаление яичников у самок мышей оказывает выраженное влияние на результаты индукции суперовуляции. При этом существенно снижается количество ооцитов, зигот и 2-клеточных эмбрионов, а также отмечается ухудшение морфологии эмбрионов. Введение животным КП оказывает выраженный терапевтический эффект и способствует более эффективной индукции суперовуляции под влиянием экзогенных гонадотропных гормонов, в результате чего увеличивается общий уровень выхода гамет и ранних эмбрионов, улучшается их морфологическое качество.

Ключевые слова: криоэкстракт плаценты, суперовуляция, ооцит, эмбрион, воспаление, мышь.

Досліджено вплив препарату "Кріоцелл-кріоекстракт плаценти" (КП) на індукцію суперовуляції у лабораторних мишей при реактивному хронічному запаленні яєчників. Показано, що хронічне запалення яєчників у самок мишей виразно впливає на результати індукції суперовуляції. При цьому суттєво зменшується кількість ооцитів, зигот та 2-клітинних ембріонів, а також відмічається погіршення морфології ембріонів. Введення тваринам КП має значний терапевтичний вплив та сприяє більш ефективній індукції суперовуляції під дією гонадотропних гормонів, в результаті чого збільшується загальний рівень виходу гамет і ранніх ембріонів, покращується їхня морфологічна якість.

Ключові слова: кріоекстракт плаценти, суперовуляція, ооцит, ембріон, запалення, миша.

The effect of placental cryoextract (PC) on the results of superovulation in laboratory mice with syndrome of chronic ovary inflammation was studied. It is shown that chronic ovary inflammation in mice females affects significantly the results of superovulation. The quantity of oocytes, zygotes and 2-cell embryos as well as morphologic quality of the embryos decrease significantly. PC administration in the animals manifests pronounced therapeutic action and promotes more effective superovulation under exogenous gonadotropic hormones administration. The increase in the total number of gametes and early embryos was found. It was also found that the morphology of gametes and early embryos after application of CP improved significantly.

Key words: placenta cryoextract, superovulation, oocyte, embryo, inflammation, mice.

Воспалительные процессы органов малого таза у женщин составляют 74–80% гинекологических заболеваний [5]. Часто острые воспалительные процессы переходят в хронические с длительным вялотекущим течением.

Актуальной проблемой современной гинекологии является определение особенностей лечения бесплодия с использованием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза с целью повышения эффективности их лечения. Данная группа больных имеет клинико-анамнестические особенности и отличия гормонального и иммунного гомеостаза от пациенток с другими причинами бесплодия. Имеются сообщения о том, что хронические воспалительные заболевания органов малого таза

Inflammatory processes of small pelvis organs in women make 74–80% of the diseases [5]. Frequently acute inflammatory processes pass into chronic ones, proceeding lastingly and slowly.

An actual task of current gynecology is the determining the peculiarities of infertility treatment using assisted reproductive technologies (ART) in the patients with small pelvis organs' chronic inflammatory diseases to increase their treatment efficiency. This group of patients has clinical anamnestic peculiarities and differences of hormonal and immune homeostasis from the patients with other infertility causes. There are the reports that small pelvis organs' chronic inflammatory diseases are the factors aggravating the ART results [18].

In presence of chronic inflammatory process the necessity of its correction is of no doubt. Widely used

¹Харьковский национальный медицинский университет

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+380 57) 373-38-71, факс: (+380 57) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

являются фактором, который ухудшает результаты ВРТ [18].

При наличии хронического воспалительного процесса необходимость его коррекции не вызывает сомнений. Широко используемые методы лечения, основанные на антибиотикотерапии, не дают и не могут дать стойкого положительного эффекта, так как у таких пациентов нарушены механизмы иммунного гомеостаза и показана не только этиотропная, но и патогенетическая терапия.

В связи с развитием новых направлений в криобиологии расширились возможности клиницистов по использованию препаратов из тканей фетоплацентарного комплекса, которые даже при длительном хранении сохраняют свои биологические эффекты [2, 3, 6, 7, 9].

Криоэкстракт плаценты (КП), являясь одним из наиболее простых в хранении и использовании криопрепаратов, обладает выраженными иммунокорректирующими и регенеративными свойствами и выгодно отличается от препаратов, подвергнутых термической обработке [6, 7, 12, 13]. Экстракты плаценты долгое время использовались как активаторы физиологических функций организма человека [16].

Поскольку изучение функционального состояния репродуктивных клеток человека сопряжено с рядом морально-этических и технических сложностей, особую актуальность приобретает проблема моделирования процессов хронического воспаления репродуктивных органов экспериментальных животных, максимально приближенных к тем, которые происходят в организме женщины. Общепринято, что лабораторная мышь является адекватной клинической моделью для изучения эмбриологического этапа процедуры IVF как одного из основных этапов ВРТ, в частности – влияния экзогенных гонадотропных гормонов, применяемых для индукции суперовуляции, на качество гамет и последующее развитие эмбрионов [14, 15].

Цель работы – изучение влияния криоэкстракта плаценты на индукцию суперовуляции у лабораторных мышей с синдромом хронического воспаления яичников.

Материалы и методы

Опыты проводили на самках мышей гибрида F₁ (CBA×C57Bl) с массой 18–20 г. Животных разделили на три группы: контрольную (14 животных) и две экспериментальные (21 животное). Хроническое воспаление яичников у животных экспериментальных групп моделировали одноразовым введением внутрибрюшинно 1 мг λ-карагинена (Sigma, США) в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия [4]. Самкам мышей экспериментальной

treatment methods, based on antibiotic therapy do not provide and can not provide the stable positive effect, since in such patients the mechanisms of immune homeostasis are impaired and they are prescribed both with etiotropic and pathogenetic therapy.

Development of new trends in cryobiology extended the possibilities of clinical workers in using the preparations derived from the tissues of fetoplacental complex, which even after long-term storage preserve their biological effects [2, 3, 6, 7, 9].

Placental cryoextract (PC) being one of the simplest in storage and usage preparations possesses manifested immune correcting and regenerative properties and compares favourably with the preparations subjected to thermal processing [6, 7, 12, 13]. Placental extracts for a long time have been used as the activating agents of human physiological functions [16].

Since the study of functional state of human reproductive cells is associated with some moral and ethical, as well as technical complications a special actuality is gained by the problem of simulating the chronic inflammation of reproductive organs of experimental animals under conditions maximally approached to those occurring in woman's organism during the ART. It is well known that a laboratory mouse is an adequate clinical model to study embryological stage of IVF procedure as the main ART stage, in particular, the effect of exogenous gonadotropic hormones, applied for the induction of superovulation, the quality of gametes and following development of embryos [14, 15].

The research aim is to study the effect of placental cryoextract on superovulation induction in laboratory mice with the syndrome of chronic ovary inflammation.

Materials and methods

The experiments were carried-out in female mice of hybrid F₁ (CBA×C57Bl) with the mass of 18–20 g. The animals were divided into three groups: control (14 animals) and two experimental (21 animals). Chronic ovary inflammation in the animals of experimental groups was simulated with single intraperitoneal introduction of 1 mg λ-carrageenan (Sigma, USA) in 0.5 ml of isotonic sodium chloride [4]. Female mice of experimental group 1 (12 animals) once a day during 5 days were subcutaneously introduced with 0.2 ml sodium chloride isotonic solution, the first introduction was done just after the injection of λ-carrageenan. The animals of experimental group 2 (9 animals) once a day for 5 days were subcutaneously introduced with 0.2 ml "Cryocell-placental cryoextract" preparation (Certificate of State Registration of Ukraine N604/06300200000 dated of 04.07.2006), the first introduction was done just after injection of λ-carrageenan. The volume of the introduced preparation for laboratory animals was calculated on the method of dosing

группы 1 (12 животных) раз в сутки на протяжении 5 дней вводили подкожно 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия, первое введение – сразу после инъекции λ -карагинена. Животным экспериментальной группы 2 (9 животных) раз в сутки на протяжении 5 дней вводили подкожно 0,2 мл препарата “Криоцелл – криоэкстракт плаценты” (сертификат о государственной регистрации Украины №604/06300200000 от 04.07.2006), первое введение – непосредственно после инъекции λ -карагинена. Объем вводимого препарата для лабораторных животных рассчитывали по методу дозирования веществ для млекопитающих с учетом констант биологической активности и коэффициента видовой устойчивости. Характеризуя резистентность млекопитающих к ксенобиотикам, коэффициент видовой устойчивости учитывает такие параметры, как основной обмен, объем сердечной деятельности, уровень развития центральной нервной системы [8]. Расчетная величина дозы КП составила 0,2 мл для мыши массой 20 г.

На 21-е сутки воспаления у экспериментальных животных вызывали суперовуляцию путем внутрибрюшинной инъекции 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (“Folligon”, Голландия) и 7,5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) (“Chorulon”, Голландия) с интервалом между инъекциями 46–48 ч. У животных контрольной группы суперовуляцию индуцировали аналогичным образом. Ооциты и эмбрионы мыши выделяли по стандартной методике [1]. Ооциты в составе ооцит-кумулюсных комплексов выделяли через 12–13 ч после инъекции чХГ путем прокалывания ампулярного отдела отпрепарированных яйцеводов в теплой фосфатно-буферной среде Дюльбекко с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (“Sigma”, США). Для удаления клеток кумулюса ооциты экспонировали в течение 2–5 мин в теплом растворе (37°C) гиалуронидазы (“Sigma”, США) с концентрацией 0,1 мг/мл (150 ед/мл), приготовленном на физиологической среде Дюльбекко. Для получения эмбрионов самок после инъекции чХГ подсаживали к самцам той же линии на ночь для осеменения. День обнаружения копуляционной пробки считался первым днем беременности. Зиготы выделяли через 24 ч после инъекции чХГ, 2-клеточные эмбрионы получали через 48 ч после инъекции чХГ. Полученные ооциты и эмбрионы трижды отмывали в среде и немедленно использовали в эксперименте.

Качество ооцитов и ранних эмбрионов оценивали по морфологическим критериям, а также по состоянию хромосомного аппарата клеток после окрашивания ДНК-специфическим красителем Hoechst 33342 (“Sigma”, США). Эмбрионы экспо-

the substances for mammals taking into account the constants of biological activity and coefficient of species resistance. When characterizing the resistance of mammals to xenobiotics, the coefficient of species resistance comprise such parameters as main exchange, volume of cardiac activity, level of development of central nervous system [8]. The calculated PC dose made 0.2 ml for 20 g mouse.

To the 21st day of inflammation in experimental animals the superovulation was initiated by means of injection of 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (“Folligon”, Holland) and 7.5 IU human chorionic gonadotropin (hCG) (“Chorulon”, Holland) with the interval between the injections of 46–48 hrs. In the animals of the control group superovulation was induced by the similar way. Oocytes and embryos of mice were isolated according to the standard methods [1]. Oocytes as the part of oocyte-cumulus complexes were isolated in 12–13 hrs after injection of hCG by means of puncture of ampular part of the oviducts subjected to preparation in warm phosphate buffered Dulbecco’s medium supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma, USA). To remove the cumulus cells the oocytes were exposed for 2–5 min in warm solution (37°C) of hyaluronidase (Sigma, USA) with the concentration of 0.1 mg/ml (150 units/ml) prepared with Dulbecco’s physiological medium. To obtain embryos after injection of hCG the females were placed together with males of the same breed for a night for insemination. The day of revealing the copulation plug was considered as the first day of pregnancy. Zygotes were isolated in 24 hrs after injection of hCG, two-cell embryos were obtained 48 hrs later the injection of hCG. The resulted oocytes and embryos were thrice washed in the medium and immediately used in the experiment.

The quality of oocytes and early embryos was assessed on morphological criteria as well as on the state of chromosome apparatus of cells after staining with DNA-specific dye Hoechst 33342 (Sigma, USA). The embryos were exposed for 30 min at 37°C in 0.1% solution of Hoechst 33342, prepared with Dulbecco medium (Sigma, USA). Final concentration of the dye in incubation medium made 10^{-5} mol/l. The state of nuclear material of embryos after staining was estimated with microscope LSM510 META (Carl Zeiss, Germany) at excitation wavelength of 405 nm. Emission was recorded at 465 nm.

The experiments in animals were done in accordance with "General principles of the experiments in animals", approved at the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2007) and coordinated with the statements of "European Convention on Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, France, 1985).

нировали в течение 30 мин при 37°C в 0,1%-м растворе Hoechst 33342, приготовленном на среде Дюльбекко ("Sigma", США). Конечная концентрация красителя в среде инкубирования составляла 10⁻⁵ моль/л. Состояние ядерного материала эмбрионов после окрашивания исследовали под микроскопом LSM510 META (Carl Zeiss, Германия) при длине волны возбуждения 405 нм. Эмиссию регистрировали на длине волны 465 нм.

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2007) и согласованными с положениями "Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, Франция, 1985).

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. В расчетах применяли пакет статистического анализа данных программы "Excel-2007".

Результаты и обсуждение

При анализе полученных данных наиболее значимые и достоверные различия между выделенными группами были установлены по таким показателям, как уровень выхода зрелых ооцитов на стадии МII мейоза и количество ранних эмбрионов, полученных после гормональной стимуляции яичников.

В табл. 1 представлены результаты количественной оценки выхода зрелых ооцитов мыши (через 13 ч после введения чХГ) в контрольной и экспериментальных группах животных. Как видно, в группе 1 получено статистически достоверно меньше ооцитов в пересчете на одно животное, чем в контрольной. Уровень выхода ооцитов в экспериментальной группе 2 был достоверно выше по сравнению с таковым в экспериментальной группе 1. Достоверных различий по этим показателям между животными контрольной группы и экспериментальной группы 2 получено не было ($p > 0,05$). Следует отметить, что в выделенном материале как в контрольной, так и в экспериментальной группе 2 наряду с ооцит-кумуляными комплексами присутствовали в небольшом количестве ооциты без клеток кумулюса, что, по всей видимости, связано с непосредственным влиянием процедуры индукции суперооуляции, а также "ответом" яичников на гонадотропную стимуляцию.

The data were statistically processed using the Student's t-criterion. In calculations for statistical analysis the MS Excel 2007 software was used.

Results and discussion

When analyzing the findings the most statistically significant differences between the chosen groups were revealed on such parameters as the yield of mature oocytes at meiosis stage MII and number of early embryos obtained in the result of ovary hormonal stimulation.

Table 1 shows the results of qualitative estimation of the yield of mature murine oocytes (13 hrs later introduction of hCG) in the control and experimental groups of animals. It is seen, that amount of oocytes per one animal in the group 1 was statistically and significantly lower than in the control group. The level of yield of oocytes in the experimental group 2 was significantly higher if compared with that in experimental group 1. No statistically significant differences on these indices between animals of the control group and experimental group 2 were found ($p < 0.05$). It should be noted that in isolated material both in the control and experimental group 2 along with oocyte-cumulus complexes the oocytes without cumulus cells were present in a small amount, that is probably related to direct effect of the procedure of superovulation induction, as well as the "response" of ovaries to gonatropic stimulation.

Thus comparative estimation of the rates of oocyte yield in the animals of the control and experimental groups enables to state that chronic inflammatory process results in the aggravation of the "response" of

Таблица 1. Количественные результаты индукции суперооуляции у мышей в контрольной и экспериментальных группах

Table 1. Quantitative results of superovulation induction in mice in the control and experimental groups

Группы животных Group of animals	Количество животных в группе Number of animals per group	Количество зрелых ооцитов (MII) Number of matured oocytes (MII)	
		Общее количество ооцитов Total number of oocytes	Количество ооцитов на 1 животное Number of oocytes per animal
Контроль Control	5	82	16,4 ± 1,06
Группа 1 Group 1	4	43	10,7 ± 7,1*
Группа 2 Group 2	3	47	15,67 ± 8,0#

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с группой 1.

Notes: * – $p < 0.05$ if compared with the control; # – $p < 0.05$ if compared with the group 1.

Таким образом, сравнительная оценка уровней выхода ооцитов у животных контрольной и экспериментальных групп позволяет утверждать, что хронический воспалительный процесс приводит к ухудшению “ответа” яичников на стимуляцию гонадотропинами, выражающуюся в достоверном уменьшении количества получаемых ооцитов. При введении КП восстанавливается способность яичника реагировать на индукцию суперовуляции на фоне хронического воспалительного процесса, что отражается в достоверном увеличении количества ооцитов. Наличие в получаемом материале “бескумулюсных” ооцитов свидетельствует о более активном “ответе” яичников животных контрольной и экспериментальной группы 2 на действие гонадотропных гормонов.

В табл. 2 представлены результаты морфологической оценки презумптивных зигот, полученных от животных контрольной и экспериментальных групп.

Как видно из представленных данных, в контрольной группе количество одноклеточных эмбрионов, приходящееся на одно животное, достоверно выше, чем в экспериментальной группе 1 ($24,0 \pm 4,2$ и $11,3 \pm 2,3$, $p < 0,001$) и сравнимо с уровнем выхода зигот в экспериментальной группе 2 ($21,7 \pm 5,8$, $p > 0,05$). Достоверные различия по этому показателю установлены и между экспериментальными группами ($p < 0,001$). Для более полного анализа качества получаемого материала в нашей работе мы использовали окрашивание презумптивных зигот флуоресцентным красителем Hoescht-33342 с целью оценки ядерного материала эмбрионов. На рис. 1 представлены характерные микроскопические изображения зигот мыши контрольной и экспериментальных групп.

Как видно из представленных данных (табл. 2) в контрольной группе животных 69,4% зигот находились на стадии сближающихся пронуклеусов, что соответствовало нормальной морфологии зигот, выделенных через 24 ч после введения чХГ. В экспериментальных группах животных эти показатели достоверно не отличались от контроля и составили 73 и 76,9% соответственно.

Количество эмбрионов аномальной морфологии согласно визуальной оценке (наличие фрагментарных форм по типу “виноградной грозди”) в контрольной и экспериментальных группах 1 и 2 составило 30,5, 26,6 и 23,1% соответственно. Окрашивание Hoescht 33342 позволило выявить в одноклеточных

ооцитах стимуляцию с гонадотропинами, manifested in statistically significant lessening the number of the resulted oocytes. During introduction of PC the ability of ovary to respond to the superovulation induction restores on the background of chronic inflammatory process, that is reflected in statistically significant rise in the number of oocytes. The presence of “cumulus-free” oocytes in the obtained material testifies to more active “response” of animal ovaries of both the control and experimental group 2 to the effect of gonadotropic hormones.

Table 2 demonstrates the results of morphological estimation of presumptive zygotes, derived from the animals of the control and experimental groups.

As it is seen from the presented data in the control group the number of one-cell embryos per one animal is statistically and significantly higher than in the experimental group 1 (24.0 ± 4.2 and 11.3 ± 2.3 , $p < 0.001$) and comparable with the yield rate of zygotes in experimental group 2 (21.7 ± 5.8 , $p > 0.05$). Statistical differences on these indices have been found also between experimental groups ($p < 0.001$). For more complete analysis of the quality of the material obtained in our research we used the staining of presumptive zygotes with fluorescent dye Hoescht-33342 to assess the nuclear material of the embryos. Figure 1 presents the characteristic microscopic images of mice zygotes of the control and experimental groups.

As it is seen from the data (Table 2) in the control group of animals 69.4% zygotes were at the stage of

Таблица 2. Количественная и морфологическая оценка одноклеточных эмбрионов, полученных в результате индукции суперовуляции в выделенных группах животных.

Table 2. Quantitative and morphological assessment of one-cell embryos obtained as the result of superovulation induction in the selected groups of animals

Группы животных Group of animals	Количество одноклеточных эмбрионов Number of 1 cell embryos		
	Общее количество Total number	Эмбрионов на 1 животное Embryos per animal	Клеток аномальной морфологии (% от общего количества) Cells with abnormal morphology (% of total number)
Контроль Control (n = 3)	72	$24,0 \pm 4,2$	22 (30,5%)
Группа 1 Group 1 (n = 4)	45	$11,3 \pm 2,2^*$	12 (26,6%)
Группа 2 Group 2 (n = 3)	65	$21,7 \pm 5,8^{\#}$	15 (23,1%)

Примечание: * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,001$ по сравнению с группой 1.

Notes: * – $p < 0.001$ if compared with the control; # – $p < 0.001$ if compared with the group 1.

эмбрионах аномалии ядерного материала: фрагментация хромосом и их рассеивание по цитоплазме, отсутствие пронуклеусов. Достоверных различий между группами по этим показателям не было выявлено ($p > 0,05$). Следует отметить, что эмбрионы экспериментальных групп были менее устойчивы к самой процедуре инкубации в растворе красителя, чем контрольные. Это косвенно свидетельствует о снижении резистентности ооцитов к химическим и физическим воздействиям на фоне хронического воспалительного процесса.

При оценке количественных показателей выхода эмбрионов на стадии двух бластомеров установлено, что количество 2-клеточных эмбрионов, приходящихся на одно животное, в контрольной группе было достоверно выше, чем в экспериментальных ($p < 0,001$) (табл. 3).

Достоверных различий по уровню выхода 2-клеточных эмбрионов между экспериментальными группами обнаружено не было ($p > 0,05$).

При оценке морфологии 2-клеточных эмбрионов к аномальным относили тех, в которых наблюдалась полная либо частичная фрагментация одного или двух бластомеров по типу “виноградной грозди”, что свидетельствует о поздней стадии апоптоза. Окрашивание Hoechst 33342 позволило обнаружить остановку (блок) некоторых эмбрионов на стадии зиготы, а также наличие фрагментации ядерного материала.

Количество эмбрионов с аномальной морфологией в экспериментальных и контрольной группах было сравнимо (табл. 3), однако следует отметить, что в группе 2 наблюдалась тенденция к увеличению выхода морфологически интактных эмбрионов (рис. 2)

Известно, что качество ооцитов и дальнейшее развитие эмбрионов зависят от множества факторов: состояния и возраста самок-доноров, генетической линии мышей, условий и состава среды инкубации, влияния экзогенных гонадотропных гормонов на процесс овуляции. Качество ооцитов, в свою очередь, влияет на способность эмбрионов после оплодотворения к последующему делению дробления. Эмбрионы, имеющие различные повреждения, удаляются в процессе деления дробления в результате апоптоза [19, 20].

Показано, что разработанный ранее и использованный в данной работе метод моделирования реактивного хронического воспаления яичников с использованием λ -карагинена существенно влияет на функцию яичников мышей и окружающих их тканей [4]. Результаты данного исследования по-

approaching pronuclei, that corresponded to normal morphology of zygotes, isolated 24 hrs later hCG introduction. In experimental groups of animals these indices statistically and significantly did not differ from the control and made 73 and 76.9%, correspondingly.

The number of embryos of abnormal morphology according to visual estimation (presence of fragmentary forms like "grape bunch") in the control and experimental groups 1 and 2 made 30.5, 26.6 and 23.1%, correspondingly. The staining with Hoechst 33342 enabled to reveal in one-cell embryos the abnormalities of nuclear material: fragmentation of chromosomes and their dissemination in cytoplasm and absence of pronuclei. No statistically significant differences between the groups on these indices were revealed ($p > 0.05$). It should be noted that embryos of experimental groups were less resistance to the procedure of incubation itself in dye solution if compared with the control ones. This indirectly testifies to a reduced resistance of oocytes to chemical and physical effects on the background of chronic inflammatory process.

When estimating the quantitative parameters of embryos' yield at the stage of two blastomeres it has been found that the number of two-cell embryos per one animal in the control group was statistically and significantly higher than in experimental ones ($p < 0.001$) (Table 3).

No statistical and significant differences in the rate of yield of two-cell embryos between experimental groups were revealed ($p > 0.05$).

When assessing the morphology of two-cell embryos those were referred as abnormal wherein com-

Таблица 3. Количественная и морфологическая оценка двухклеточных эмбрионов, полученных в результате индукции суперовуляции в выделенных группах животных
Table 3. Quantitative and morphological assessment of two-cell embryos obtained as the result of superovulation induction in the selected groups of animals

Группы животных Group of animals	Количество двухклеточных эмбрионов Number of 2 cell embryos		
	Общее количество Total number	Эмбрионов на 1 животное Embryos per animal	Клеток аномальной морфологии (% от общего количества) Cells with abnormal morphology (% of total number)
Контроль Control (n=6)	166	27,7±0,4	44 (26,5%)
Группа 1 Group 1 (n=4)	58	14,5 ± 7,6*	17 (29,3%)
Группа 2 Group 2 (n=3)	38	12,7±1,8*	9(23,7%)

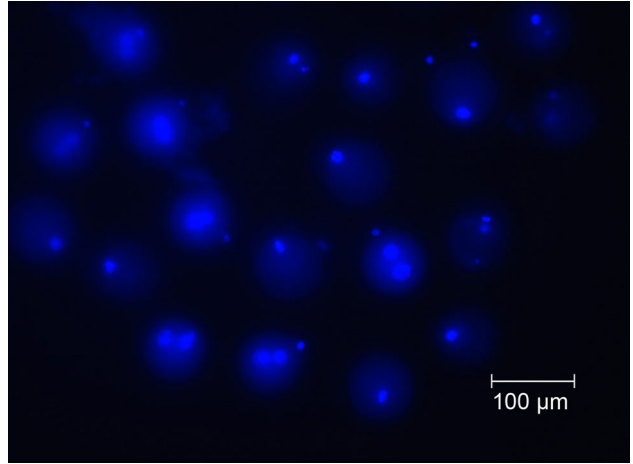
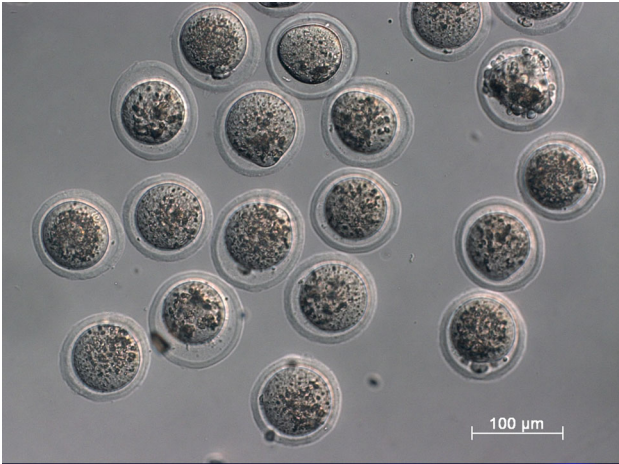
Примечание: * – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Notes: * – $p < 0.001$ if compared with the control.

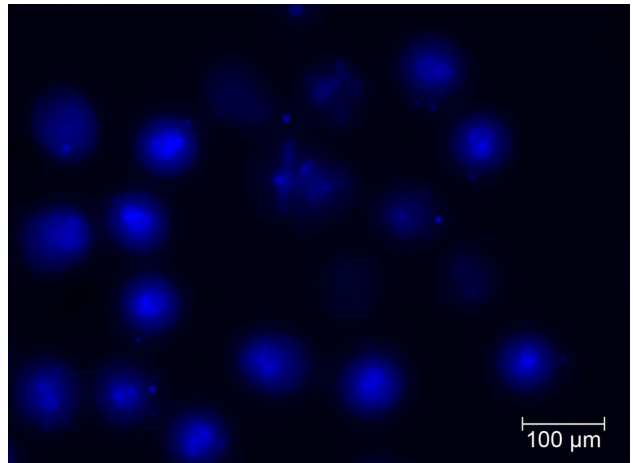
Неокрашенные клетки
Non-stained cells

Клетки, окрашенные Hoechst 33342
Hoechst 33342 stained cells

Контроль Control



Группа 1 Group 1



Группа 2 Group 2

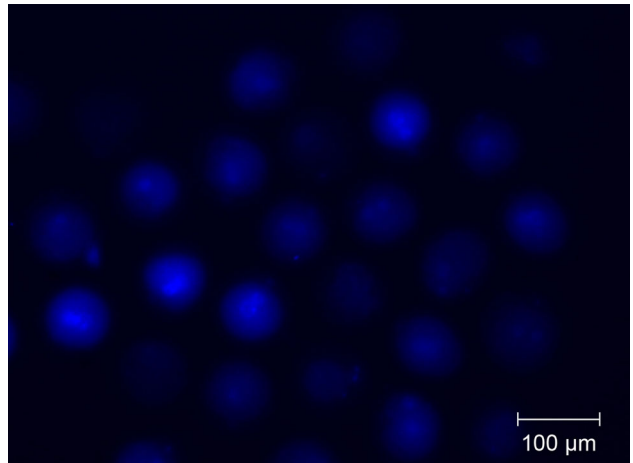
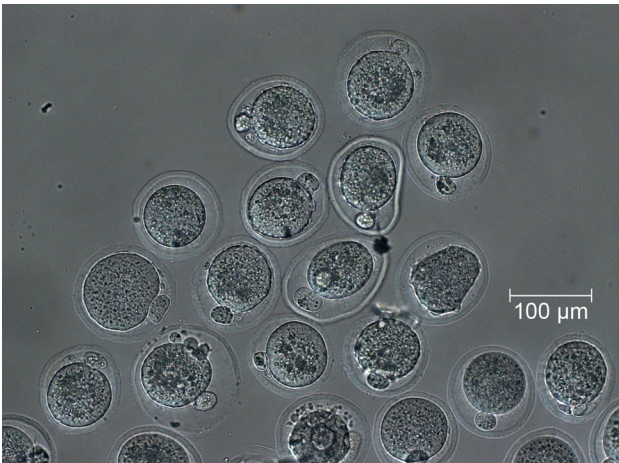


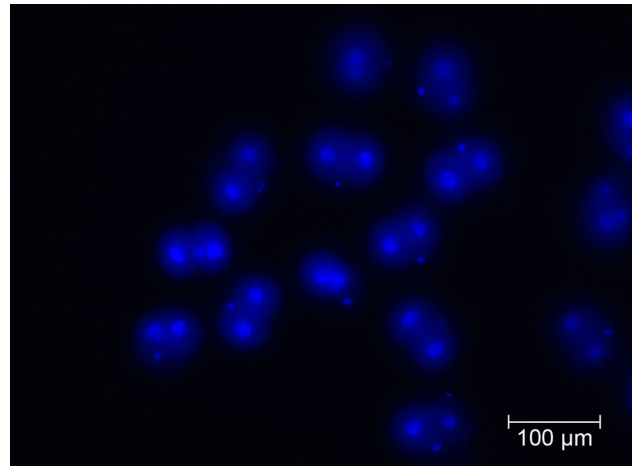
Рис. 1. Микрофотографии презумптивных зигот мыши.

Fig. 1. Microphotos of murine presumptive zygotes.

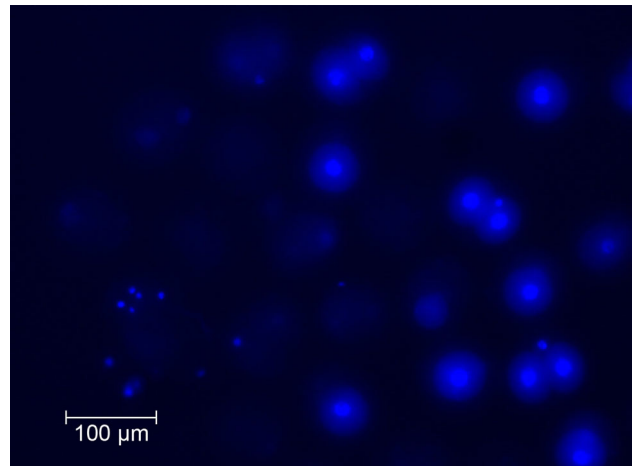
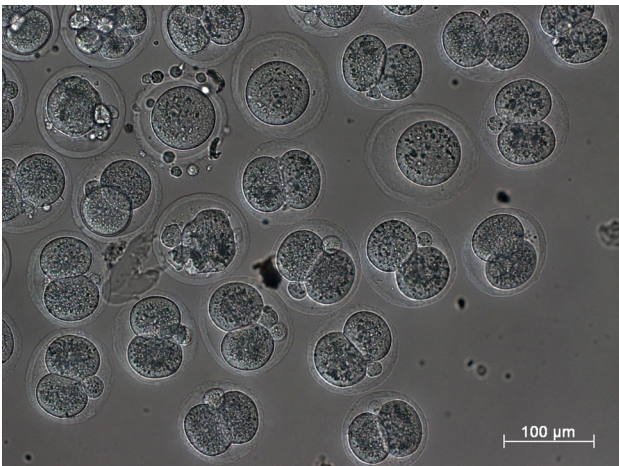
Неокрашенные клетки
Non-stained cells

Клетки, окрашенные Hoechst 33342
Hoechst 33342 stained cells

Контроль Control



Группа 1 Group 1



Группа 2 Group 2

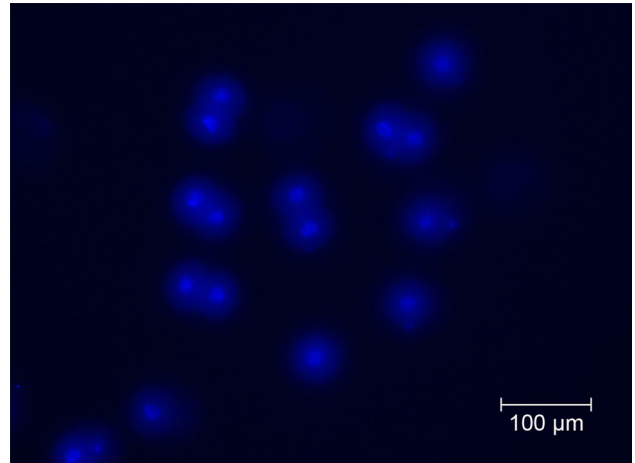
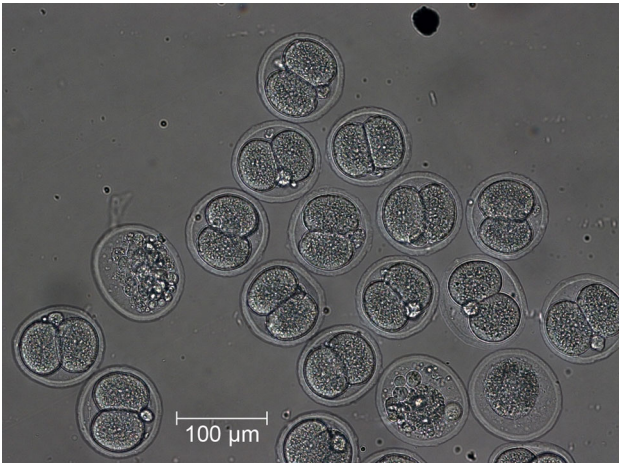


Рис. 2. Микрофотографии 2-клеточных эмбрионов мыши.
Fig. 2. Microphotos of two-cell murine embryos.

казали, что индукция хронического воспаления у самок мышей существенно снижает количество ооцитов, зигот и 2-клеточных эмбрионов, а также приводит к ухудшению морфологии эмбрионов, что свидетельствует о запуске апоптотических реакций как в яичниках, так и в ооцитах, полученных в результате индукции суперовуляции. Можно предположить, что основной каскад апоптотических реакций, вызванный хроническим воспалением, проявляется главным образом в атрезии примордиальных фолликулов, снижении их рецептивности к гонадотропинам и, как следствие, в уменьшении количества ооцитов после индукции суперовуляции. Введение препарата "Криоцелл – криоэкстракт плаценты" самкам мышей с реактивным воспалением яичников способствует более эффективной индукции суперовуляции гонадотропными гормонами. Этот факт подтверждается достоверным увеличением количества ооцитов и одноклеточных эмбрионов в пересчете на одно животное в экспериментальной группе 2 по сравнению с группой 1 и фактически достижением уровня соответствующих показателей контрольной группы. Один из механизмов позитивного влияния КП, по-видимому, связан с действием его гормональных компонентов – прогестерона, эстрадиола, пролактина, гонадотропинов. Хотя объяснить эффект подобной терапии исключительно гормональной составляющей невозможно.

Достоверные отличия в морфологических характеристиках эмбрионов между контрольными и экспериментальными группами животных в нашей работе не обнаружены, однако была отмечена тенденция к снижению качества эмбрионов в группе 1 и возврату к показателям контроля в группе 2. Известно, что на качество ооцитов и последующее развитие эмбрионов существенное влияние оказывает также и гормональная стимуляция экзогенными гонадотропными гормонами. В пользу этого свидетельствует тот факт, что в общем пуле гамет, полученных от животных контрольной группы и экспериментальной группы 2, присутствуют ооциты без кумулюса. Неоднократно показано, что введение экзогенных гонадотропных гормонов (ГСЖК и чХГ) оказывает существенное влияние на качество и степень зрелости ооцитов [11, 16, 20]. Препараты с фолликулостимулирующей активностью (ГСЖК) влияют на фолликулы двояко: увеличивают митотическую активность в мелких фолликулах и защищают от атрезии более крупные. Однако наряду с увеличением общего количества ооцитов в результате суперовуляции увеличивается количество ооцитов с признаками дегенерации или скрытыми нарушениями [10]. По всей видимости, эти воздействия усугубляются, наслаиваясь на патологический фон, сопутствующий хроническому воспалительному процессу.

plete or partial fragmentation of one or two blastomeres on type of "grape bunch" was observed, testifying to late apoptosis stage. Staining with Hoechst 33342 enabled the revealing of the blocking of some embryos at the zygote stage, as well as the presence of fragmentation of nuclear material.

The number of embryos with abnormal morphology in experimental and control groups was comparable (Table 3), however it should be noted that in the group 2 the tendency to a rise in the yield of morphologically intact embryos was observed (Fig. 2).

It is known that the quality and further development of embryos depend on numerous factors: state and age of donor females, genetic line of mice, conditions and composition of incubation medium, effect of exogenous gonadotropic hormones on ovulation process. Quality of oocytes, in its turn, affects the ability of embryos after fertilization to following fission. The embryos with different impairments are withdrawn during fission process as a result of apoptosis [19, 20].

It has been shown that developed previously and used in this research method of modelling a reactive chronic inflammation of mice ovaries using λ -carrageenan significantly affects the function of ovaries and surrounding tissues [4]. The results of this study have shown that induction of chronic inflammation in female mice significantly reduces the number of oocytes, zygotes and two-cell embryos, as well leads to aggravation of embryo morphology, testifying to initiation of apoptotic reactions both in ovaries and oocytes, derived as the result of ovulation induction. One may suppose that the main cascade of apoptotic reactions caused with chronic inflammation is basically manifested in atresia of primordial follicles, reduction of their receptivity to gonadotropins and as a consequence in lessening the number of oocytes after superovulation induction. Introduction of the "Cryocell – placental cryoextract" preparation to female mice with reactive ovary inflammation contributes to more effective induction of superovulation with gonadotropic hormones. This fact is confirmed with statistical and significant rise in the number of oocytes and one-cell embryos per one animal in experimental group 2 if compared with group 1 and actually approaching the level of corresponding indices of the control group. One of the mechanisms of PC positive effect is likely related to the effect of its hormonal components: progesterone, estradiol, prolactin, gonadotropins. Though the explaining of the effect of this therapy with hormonal component is impossible.

No statistically significant differences in morphological characteristics of embryos between the control and experimental groups of animals in our research were found, however the tendency to the reduction of the quality of embryos in the group 1 and reversion to the control indices in the group 2 was noted. It is known that quality of oocytes and following development of

Выводы

Проведенные исследования показали, что хроническое реактивное воспаление яичников у самок мышей оказывает выраженное влияние на результаты индукции суперовуляции. У животных с моделированным воспалением яичников существенно снижается количество ооцитов, зигот и 2-клеточных эмбрионов, а также отмечается ухудшение морфологии эмбрионов при индукции суперовуляции.

Введение криоэкстракта плаценты самкам мышей с синдромом реактивного воспаления яичников оказывает выраженное терапевтическое действие и способствует более эффективной индукции суперовуляции под влиянием экзогенных гонадотропных гормонов, вследствие чего увеличивается относительное количество гамет и ранних эмбрионов. Отмечены тенденции к ухудшению морфологических характеристик эмбрионов на фоне воспалительного процесса и их улучшению после терапии криоэкстрактом плаценты.

Авторы благодарят ст.н.с. Коваленко И.Ф., н.с. Холодного В.С. за методическую помощь в работе, ст.н.с. Гончарук Е.И. – за помощь в планировании и обсуждении результатов эксперимента.

Литература

1. *Биология развития млекопитающих. Методы* / Под ред. М. Манк.– Москва: Мир, 1990.– 406 с.
2. Грищенко В.И., Питько В.А., Нерадовська О.В. Застосування тканинних біопрепаратів в лікуванні хворих з запальними процесами придатків матки // Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України.– Київ, 2000.– С. 420–422.
3. Грищенко В.И., Юрченко Т.Н., Прокопюк О.С. Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине // Трансплантологія.– 2004.– Т. 7, №3.– С. 123–129.
4. Грищенко Н.Г., Клименко Н.А., Гоголь Н.И., Татарко С.В. Обоснование модели реактивного хронического воспаления яичников у мышей // Теоретична і експериментальна медицина.– 2009.– №4.– С. 10–17.
5. Дубоссарская З.М., Милянковский А.И., Коляденко В.Г. Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов.– Київ: Здоров'я, 1991.– 151 с.
6. Питько В.А., Грищенко В.И., Суббота Н.П. Влияние криоэкстракта хориона на состояние иммунитета у женщин с подострым сальпингоофоритом // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 81–85.
7. Питько В.А. Динамика биохимических показателей в плазме крови женщин с подострым сальпингоофоритом при трансплантации криоконсервированной хоральной ткани // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 76–79.
8. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Докл. АН СССР.– 1979.– Т. 247, №6.– С. 1513– 1516.
9. Юрченко Т.Н., Прокопюк О.С., Ломако В.В. Клеточная и тканевая трансплантация. Биопрепараты.– Харьков, 2003.– 67 с.

embryos is affected significantly by hormonal stimulation with exogenous hormones. The fact that in total pool of gametes derived from animals of the control group and in the experimental group 2 there are cumulus-free oocytes testifies to this favour. Not once it has been shown that introduction of exogenous gonadotropic hormones (PMSG and hCG) affects significantly the quality and maturity rate of oocytes [11, 16, 20]. Medicines with follicle stimulating activity (PMSG) affect the follicles doubly: increase mitotic activity in small follicles and protect bigger ones against atresia. However, along with the increase of total number of oocytes as a result of superovulation the number of oocytes with the signs of degeneration or hidden impairments [10] rises. These effects are apparently aggravated due to superposition of pathological background accompanying chronic inflammatory process.

Conclusions

The performed investigations have shown that chronic reactive inflammation of ovaries in female mice rendered the manifested effect on the results of superovulation induction. In the animals with simulated inflammation of ovaries the number of oocytes, zygotes and two-cell embryos significantly reduces, as well the aggravation of the morphology of embryos during superovulation induction was found.

Introduction of placental cryoextract to female mice with the syndrome of reactive inflammation of ovaries causes manifested therapeutic effect and contributes to more effective induction of superovulation under the influence of exogenous gonadotrophic hormones, due to which the relative number of gametes and early embryos increases. There has been found the tendency to aggravation of morphological characteristics of embryos on the background of inflammation process and their improvement after therapy with placental cryoextract.

The authors express their thanks to senior scientist Kovalenko I.F., scientific worker Kholodnyy V.S. for methodical assistance, to senior scientist Goncharuk E.I. for the help in designing and discussing the experimental results.

References

1. *Biology of mammals' development. Methods* / Ed. by M. Mank.– Moscow: Mir, 1990.– 406 p.
2. *Grischenko V.I., Pit'ko V. A., Neradovskaya O.V.* Application of tissue biopreparations in treatment of patients with inflammatory processes of uterine appendages// Collected volume of scientific papers of the Association of Obstetricians-Gynaecologists of Ukraine.– Kiev, 2000.– P. 420–422.
3. *Grischenko V.I., Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S.* New cryobiological technologies of obtaining cell and tissue fetoplacental transplants and their usage in medicine// *Transplantologiya*.– 2004.– Vol. 7, N3.– P. 123–129.

10. *Ertzeid G., Storeng R.* Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice // *J. Reprod. Fert.*– 1992.– Vol. 96, N4.– P. 649–655.
11. *Krisher R.L.* The effect of oocyte quality on development // *J. Anim. Sci.*– 2004.– Vol. 82, E-Suppl.– P. E14–E23.
12. *Liu K.X., Kato Y., Kaku T., Sugiyama Y.* Human placental extract stimulates liver regeneration in rats // *Biol. Pharmaceut. Bull.*– 1998.– Vol. 21, N1.– P. 44–49.
13. *Neo S., Ishikawa T., Ogiwara K. et al.* Canine bone marrow cells differentiate into hepatocyte-like cells and placental hydrolysate is a potential inducer // *Res. Veterin. Sci.*– 2009.– Vol. 87, N1.– P. 1–6.
14. *Neuber E., Powers R.D.* Is the mouse a clinically relevant model for human fertilization failures // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N1.– P. 171–174.
15. *Quinn P., Horstman F.C.* Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo *in vitro*? // *Hum. Reprod.*– 1998.– Vol. 13, Suppl. 4.– P. 173–183.
16. *Redina O.E., Amstislavsky S.Ya., Maksimovsky L.F.* Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle // *J. Reprod. Fert.*– 1994.– Vol. 102, N2.– P. 263–267.
17. *Seo T.B., Han I.S., Yoon J.H. et al.* Growth-promoting activity of hominis placenta extract on regenerating sciatic nerve // *Acta Pharmacol. Sin.*– 2006.– Vol. 27, N1.– P. 50–58.
18. *Strandell A., Bergh C., Lundin K.* Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N12.– P. 2520–2525.
19. *Takase K., Ishikawa M., Hoshiai H.* Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova // *Tohoku J. Exp. Med.*– 1995.– Vol. 175, N1.– P. 69–76.
20. *Van der Auvera, D'Hooghe T.* Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development // *Hum. Reprod.*– 2001.– Vol. 16, N6.– P. 1237–1243.
4. *Grischenko V.I., Klimenko N.A., Gogol N.I., Tatarko S.V.* Substantiation of the model of reactive chronic inflammation of murine ovaries // *Theoretical and experimental medicine.*– 2009.– N4.– P. 10–17.
5. *Dubossarskaya Z.M., Milyanovskiy A.I., Kolyadenko V.G.,* Chronic inflammatory processes of female internal genital organs.– Kiev: Zdoroviya, 1991.– 151 p.
6. *Pit'ko V.A., Grischenko V.I., Subbota N.P.* Action of chorion cryoextract on the immunity state of females with subacute salpingo-oophoritis // *Problems of Cryobiology.*– 2000.– N1.– P. 81–85
7. *Pit'ko V.A.* Dynamics of biochemical indices in blood plasm of women with subacute salpingo-oophoritis during transplantation of cryopreserved chorionic tissue // *Problems of Cryobiology.* – 2001.– N1.– P. 76–79.
8. *Rybolovlev Yu. R., Rybolovlev R.S.* Dosage of substances mammals on biological activity constants // *Doklady AN SSSR.*– 1976.– Vol. 247, N6.– P. 1513–1516.
9. *Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S., Lomako V.V.* Cell and tissue transplantation. Biopreparations.– Kharkov, 2003.– 67 p.
10. *Ertzeid G., Storeng R.* Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice // *J. Reprod. Fert.*– 1992.– Vol. 96, N4.– P. 649–655.
11. *Krisher R.L.* The effect of oocyte quality on development // *J. Anim. Sci.*– 2004.– Vol. 82, E-Suppl.– P. E14–E23.
12. *Liu K.X., Kato Y., Kaku T., Sugiyama Y.* Human placental extract stimulates liver regeneration in rats // *Biol. Pharmaceut. Bull.*– 1998.– Vol. 21, N1.– P. 44–49.
13. *Neo S., Ishikawa T., Ogiwara K. et al.* Canine bone marrow cells differentiate into hepatocyte-like cells and placental hydrolysate is a potential inducer // *Res. Veterin. Sci.*– 2009.– Vol. 87, N1.– P. 1–6.
14. *Neuber E., Powers R.D.* Is the mouse a clinically relevant model for human fertilization failures // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N1.– P. 171–174.
15. *Quinn P., Horstman F.C.* Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo *in vitro*? // *Hum. Reprod.*– 1998.– Vol. 13, Suppl. 4.– P. 173–183.
16. *Redina O.E., Amstislavsky S.Ya., Maksimovsky L.F.* Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle // *J. Reprod. Fert.*– 1994.– Vol. 102, N2.– P. 263–267.
17. *Seo T.B., Han I.S., Yoon J.H. et al.* Growth-promoting activity of hominis placenta extract on regenerating sciatic nerve // *Acta Pharmacol. Sin.*– 2006.– Vol. 27, N1.– P. 50–58.
18. *Strandell A., Bergh C., Lundin K.* Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N12.– P. 2520–2525.
19. *Takase K., Ishikawa M., Hoshiai H.* Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova // *Tohoku J. Exp. Med.*– 1995.– Vol. 175, N1.– P. 69–76.
20. *Van der Auvera, D'Hooghe T.* Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development // *Hum. Reprod.*– 2001.– Vol. 16, N6.– P. 1237–1243.

Поступила 17.08.2010

Accepted in 17.08.2010