

Abstract

УДК 618.11-002.2: 615.361.013.85.014.41

<sup>1</sup>V. Yu. Prokopyuk

<sup>1</sup>M. V. Shevchenko,

<sup>2</sup>A. O. Shchedrov,

<sup>3</sup>O. V. Prokopyuk,

<sup>4</sup>K. V. Somova,

<sup>1</sup>*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine, 61016;*

<sup>2</sup>*Kharkiv National Medical University, 4, Nauky ave., Kharkiv, Ukraine, 61000;*

<sup>3</sup>*Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, 58, Amosov str., Kharkiv, Ukraine, 61176;*

<sup>4</sup>*V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody sq., Kharkiv, Ukraine, 61000*

**THE INFLUENCE OF CRYOPRESERVED PLACENTAL EXPLANTS ON OVARIES AND UTERUS RECOVERY AFTER PELVIC INFLAMMATORY DISEASE IN THE EXPERIMENT**

Pelvic inflammatory disease is the most common gynecological pathology. A number of studies have demonstrated the effectiveness of placenta derivatives for the female genital system pathology treatment.

**The aim** of the study was to determine the effect of cryopreserved placenta explants on ovaries and uterus recovery after an infectious process.

**Materials and methods:** Inflammation was modeled on non-linear mice by the method of puncture and ligation of the cecum, followed by antibiotic therapy. For rehabilitation, intramuscular injection of cryopreserved placenta explants of 10 mg per animal was used. The numbers of ovarian generative elements, the structure of uterus, the severity of adhesions, reproductive indices in experimental animals were studied.

**The results of the study and their discussion:** It was found that the modeling of the infectious process leads to an increasing of adhesions formation, a decreasing of the primordial and primary follicles number, folliculogenesis suppression, a number of pregnant animals and fetuses decreasing. The placental explants application has no effect on uterine adhesions, leads to a number of all follicles increasing (except for primordial ones), number of fetuses increasing, but not the number of pregnant mice.

**Conclusion:** The cryopreserved placental explants application after the cured infectious process does not affect adhesion formation, leads to the stimulation of folliculogenesis, uterine hypertrophy and improvement of reproductive indices due to an increasing in the number of fetuses.

**Keywords:** pelvic inflammatory diseases, placenta, treatment, recovery, cryopreservation.

**Corresponding author:** [v.yu.prokopiuk@gmail.com](mailto:v.yu.prokopiuk@gmail.com)

Резюме

<sup>1</sup>В. Ю. Прокопюк,

<sup>1</sup>М. В. Шевченко,

<sup>2</sup>А. О. Щедров,

<sup>3</sup>О. В. Прокопюк,

<sup>4</sup>К. В. Сомова,

<sup>1</sup>*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016;*

**ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ВІДНОВЛЕННЯ ЯЄЧНИКІВ ТА МАТКИ ПІСЛЯ САЛЬПІНГООФОРИТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

**Мета дослідження** – виявлення впливу кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників та матки після перенесеного інфекційного процесу.

**Матеріали та методи.** Запалення моделювали на нелінійних мишах методом пункції та лігування сліпої кишки, проводили антибіотикотерапію. Для реабілітації застосовували кріоконсервовані експланти плаценти по 10 мг на тварину внутрішньом'язово. Дослі-

<sup>2</sup>Харківський національний медичний університет, проспект Науки, 4, м. Харків, Харківська область, 61000;

<sup>3</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти, вул. Амосова, 58, м. Харків, Україна, 61176;

<sup>4</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Харківська область, 61000

джували кількість генеративних елементів яєчників, структуру матки, вираженість злукового процесу, репродуктивні показники у експериментальних тварин.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Виявлено, що моделювання інфекційного процесу призводить до підвищеного злукоутворення, зниження кількості примордіальних, первинних фолікулів, пригніченню фолікулогенезу, зниженню кількості вагітних тварин і кількості плодів. Застосування у якості реабілітації експлантів плаценти на впливає на злуковий процес, призводить до підвищення кількості всіх фолікулів, окрім примордіальних, збільшення кількості плодів, але не кількості тварин, що завагітніли.

**Висновок.** Застосування кріоконсервованих експлантів плаценти після санованого інфекційного процесу не впливає на злукоутворення, призводить до стимуляції фолікулогенезу, гіпертрофії матки та покращення репродуктивних показників за рахунок збільшення кількості плодів.

**Ключові слова:** сальпінгофорит, запальна хвороба тазу, плацента, лікування, реабілітація, кріоконсервування.

**Автор, відповідальний за листування:** v.yu.prokopiuk@gmail.com

## Вступ

Запальні захворювання органів малого тазу є найрозповсюдженішою гінекологічною патологією, з проявами якої стикаються більшість жінок протягом життя. Наслідками запальних хвороб для жінок є безпліддя за рахунок злукоутворення та ураження яєчників, хронічний тазовий біль, порушення оваріально-менструального циклу, передчасний клімактеричний синдром [1, 2]. Лікування запальних захворювань малого тазу включає в себе елімінацію збудника та подальшу реабілітацію з відновленням функції статевих органів [3]. В ряді досліджень продемонстровано ефективність похідних плаценти (клітин, екстрактів, тканини) для лікування патології жіночих статевих органів [4–7]. Механізм цієї дії пов'язують з функцією стовбурових клітин, факторів росту, гормонів [8, 9].

Застосування біологічного матеріалу в медицині доцільно після кріоконсервування, або іншої технології зберігання, яка забезпечує час на транспортування та обстеження матеріалу [10].

В наших попередніх дослідженнях продемонстровано, що при інфекційному процесі застосування кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП) до елімінації збудника призводить до активації інфекційного процесу та погіршення репродуктивних показників, тому є протипоказаним [7]. В дослідженнях інших авторів виявлено, що при асептичному запаленні, викликаному карагеном, застосування похідних плаценти

призводить до зменшення запалення та активації функції яєчників, покращенню репродуктивних показників [4, 5, 6]. Тому актуальним питанням перспективності застосування КЕП для реабілітації після пролікованого запального процесу органів малого тазу.

**Метою дослідження** було виявлення впливу кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників та матки після перенесеного інфекційного процесу.

**Матеріали та методи.** Запалення черевної порожнини моделювали на нелінійних лабораторних мишах шляхом перев'язки та пункції нижньої третини сліпої кишки за загальноприйнятим методом пункції та легування [11]. Застосування аутобредних тварин було пов'язане з високою смертністю при моделюванні інфекційного процесу на інбредних тваринах. Лікування гострого інфекційного процесу проводили через 2 тижні, внутрішньом'язовим введенням цефтріаксону по 0,01 г 2 рази на добу протягом 7 днів. Дозу розраховували за О. В. Стефановим [12]. Мишей розділили на 3 групи по 20 у кожній: 1 – введення КЕП через 2 тижні після лікування цефтріаксоном; 2 – моделювання інфекційного процесу та антибіотикотерапія без введення КЕП, 3 – контрольна група, хібнооперовані тварини, яким проводили лапаротомію, але не травмували кишку. Через 2 тижні 10 тварин з кожної групи виводили з експерименту. Досліджували структуру яєчників та матки на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином. Підраховували середню

кількість генеративних елементів яєчників на зрізі. Для підтвердження впливу даної моделі на статеву систему через місяць після операції самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, реєстрували час від спарювання до пологів, оцінювали репродуктивні показники, після завершення лактації тварин виводили з експерименту, оцінювали злуковий процес за I – IV ступенями, де 0 ступінь – відсутність злук, I ступінь – поодинокі злуки, II ступінь – численні тонкі злуки в межах матки, що видаляються, III ступінь – численні грубі злуки в межах матки, що не видаляються, IV ступінь – грубі злуки з іншими органами, явища порушення функції кишківника.

Кріоконсервовані експланти плаценти отримували, шляхом гострого відокремлення ворсин плаценти до 2–3 мм, кріоконсервували під захистом 10% диметилсульфоксиду в середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) зі швидкістю 1°C/хв до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот та вводили підшкірно у дозі 10 мг за раніше розробленою методикою [7].

Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення TopView V 3.7. (Hangzhou TopView Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China), ImageJ V.1.48. (National Institutes of Health, USA). Для отримання статистично вірогідних висновків застосовували U-критерій Мана–Уїтні, критерій Краскела–Уолліса з застосуванням програмного забезпечення Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway).

Проведення експериментів на лабораторних тваринах проводилося відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвале-

них VI конгресом з біоетики (Київ, 2016) і узгоджених з положенням «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Плаценту отримували з інформованої згоди жінок на добровільне її надання для наукових досліджень.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Після моделювання запалення, лікування та виведення тварин з експерименту виявлено, що у всіх тварини з моделлю запального процесу було підвищено утворення злук. Так у хибнооперованих тварин запальний процес легких ступенів спостерігали лише у третини тварин. У мишей з моделюванням запалення, антибіотикотерапією злуковий процес I–II ступенів спостерігали у більшості тварин, у деяких тварин спостерігали навіть злуковий процес III ступеню. Застосування КЕП не впливало на розвиток злук (табл. 1). Таким чином, механізм підвищеного утворення злук при застосуванні КЕП при запальному процесі без антибіотикотерапії можна пов'язати саме з активацією інфекційного процесу через пригнічення запалення, як захисної реакції. При застосуванні похідних плаценти в моделях асептичного запалення (карагінанова модель) підвищеного утворення злук автори також не спостерігали. Це можна пояснити тим що в карагенановій моделі запалення не відіграє захисної ролі, втім пригнічення альтеративної та проліферативної фаз може призводити до покращення перебігу хвороби, при наявності ж інфекційного агенту протизапальні властивості є небажаними.

**Таблиця 1 – Ступінь злукового процесу в досліджуваних групах при моделюванні інфекційного процесу, %**

Група тварин	I (поодинокі злуки)	II (злуки біля матки та яєчників)	III (злуки з кишківником)	IV (конгломерат у черевній порожнині)
Запалення + КЕП	40	30	20	0
Запалення	40	40	10	0
Хибнооперовані	20	10	0	0

Після проведення морфологічного дослідження яєчників мишей було виявлено зменшення кількості примордіальних фолікулів та пригнічення фолікулогенезу після запалення, яке також відмічено деякими авторами в моделях асептичного запалення [4, 5]. Застосування КЕП після лікування інфекційного процесу призводило до стимуляції фолікулогенезу, що також співпадає з раніш отриманими даними на

інтактних тваринах та при сальпінгофориті [4, 6]. В групі тварин з КЕП значно підвищена кількість жовтих тіл та фолікулів на різних стадіях дозрівання (табл. 2.). Матки тварин після застосування КЕП характеризувалися більшою кількістю залоз, товщею всіх шарів та вираженістю ендометрію, що було описано раніше при застосуванні КЕП на інтактних тваринах [7].

**Таблиця 2 – Кількість генеративних елементів в яєчниках самиць щурів досліджуваних груп,  $M \pm m$** 

Показники	Запалення + КЕП	Запалення	Хибнооперовані
Примордіальні фолікули	4,1 ± 1,1*	3,9 ± 0,9*	6,3 ± 0,5
Первинні фолікули	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,03	1,2 ± 0,05
Вторинні фолікули	2,1 ± 0,03*	1,8 ± 0,04*	2,5 ± 0,11
Третинні фолікули	2,2 ± 0,04	1,2 ± 0,08*	2,0 ± 0,05
Атретичні фолікули	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,3 ± 0,3
Жовті тіла	3,3 ± 0,4*	3,1 ± 0,3*	4,3 ± 0,3

Примітки: \* – вірогідність різниці з контролем  $p < 0,05$

При вивченні репродуктивних показників було встановлено, що незалежно від методу лікування запального процесу кількість тварин, що завагітніли була меншою, ніж в групі хибно оперованих тварин. Час від спарювання до пологів в групі з застосуванням КЕП був значно тривалішим, що може бути пояснено дією хоріонічного гонадотропіну, який міститься в плаценті за даними літератури [6]. Кількість плодів у тварин з запаленням без лікування

КЕП була значно меншою, втім кількість плодів у тварин, які отримували КЕП статистично не відрізнялася від контролю, що можна пояснити стимуляцією овуляції, та гіпертрофією матки, які компенсують ураження яєчників та злуковий процес (табл. 3.). Втім, у трьох тварин, які не завагітніли (дві з першої групи, одна з другої) після виведення з експерименту та аутопсії були виявлені міжпетльові абсцеси, тобто антибіотикотерапія була недостатньою.

**Таблиця 3 – Репродуктивні показники у досліджуваних групах при моделюванні інфекційного процесу**

Група тварин	Кількість тварин, які завагітніли, %	Час від спарювання до пологів, діб	Кількість плодів	Середня маса плодів, г
Запалення + КЕП	70,0	40,1 ± 4,2*	7,5 ± 0,2	1,3 ± 0,3
Запалення	70,0	26,4 ± 2,2	5,9 ± 0,3*	1,1 ± 0,4
Хибнооперовані	90,0	27,1 ± 3,5	8,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3

Примітка: \* – різниця статистично значуща порівняно з хибнооперованими тваринами,  $p < 0,05$

Таким чином, можна констатувати, що КЕП є перспективними для відновлення репродуктивної системи після запалення за умов санації від збудника. Можна зробити припущення що сти-

муляція фолікулогенезу та гіпертрофія матки відбувається за рахунок статевих гормонів та факторів росту, які згідно даних літератури синтезує плацента [8, 9].

### Висновки

Застосування кріоконсервованих експлантів плаценти після санованого інфекційного процесу не впливає на утворення злук, призводить до

стимуляції фолікулогенезу, гіпертрофії матки та покращення репродуктивних показників за рахунок збільшення кількості плодів.

### Перспективи подальших досліджень

В подальшому планується вивчення перспективи застосування похідних плаценти при

відновленні органів детоксикації після запалення.

**References (список літератури)**

1. Ford GW, Decker CF. Pelvic inflammatory disease. *Dis Mon.* 2016;62(8):301-5. doi: 10.1016/j.disamonth.2016.03.015. Epub 2016 Apr 20.
2. Romashchenko OV, Vozianova SV, Rudenko AV, Yakovenko LF. Treatment of inflammatory diseases of the pelvic organs caused by mixed infection. *Woman's health.* 2016;112(6):134-40.
3. Das BB, Ronda J, Trent M. Pelvic inflammatory disease: improving awareness, prevention, and treatment. *Infect Drug Resist.* 2016;9:191-7. doi: 10.2147/IDR.S91260.
4. Grishchenko NG, Klimenko NA, Gorgol NI, Tatarko SV. The influence of placenta cryoextract on the course of chronic ovarian inflammation in mice. *Medicine today and tomorrow.* 2010;2(3):7-17.
5. Pitko VA, Subota NP. Effect of chorionic cryoextract on immunity in women with subacute pelvic inflammatory disease. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2000;1:76-80.
6. Pitko VA, Klimenko MO, Subota NP, Tatarko SV. Comparative characteristics of the anti-inflammatory action of chorionic and placental extracts. *Physical journal.* 2000;46(1):32-6.
7. Prokopyuk VYu, Grischenko OV, Prokopyuk OV, Shevchenko NO, Falko OV, Storchak AV, Schedrov AO. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study). *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017;28(3):250-65. DOI: <https://doi.org/10.15407%2Fcryo27.03.250>
8. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International.* 2018;14. doi:10.1155/2018/4837930
9. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:162. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00162
10. Prokopiuk VYu. Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018; 28(2): 139-150.
11. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, Langer R, Roth AE, Church GM, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol.* 2017;35(6):530-42. DOI: 10.1038/nbt.3889
12. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 2009;4(1):31-6.
13. Stefanov OV, редактор. *Doklinichni doslidzhennya likarskikh zasobiv: metod. rekomendatsii.* Kyiv: Avitsena, 2001. 528 p. [in Ukrainian].

(received 15.07.2019, published online 29.09.2019)

(одержано 15.07.2019, опубліковано 29.09.2019)