

УДК: [618.11-008.64-02:616-006.6-085.28]-092.9-035-085.361.013.85:602.9

СКИБИНА К.П., КОЗУБ Н.И., ПРОКОПЮК В.Ю.

Харьковская медицинская академия последипломного образования,
кафедра акушерства и гинекологии №2, г.Харьков
Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ КРИОЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ЯИЧНИКОВ, ВЫЗВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИЕЙ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ) является частым последствием лечения онкологических заболеваний. В настоящее время актуальной задачей является поиск новых способов восстановления и сохранения функции яичников у женщин, перенесших химиотерапию (ХТ).

Цель исследования: сравнить терапевтические эффекты криоэкстракта плаценты (КП) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в восстановлении половой функции при овариальной недостаточности после ХТ в эксперименте.

Материалы и методы: ПНЯ моделировали на самках мышей линии BALB/c. Животных распределили на 4 группы по 15 самок весом $20,1 \pm 1,1$ г с регулярным эстральным циклом: 1 — контрольная группа, 2 — группа с моделью ПНЯ, 3 — группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение КП (по 0,01 г в/м 1 р/сут 5 дней). 4- группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение МСК ЖТ (100000 клеток внутривнутрибрюшинно однократно). Исследовали вес, эстральный цикл, половую активность, морфологические изменения репродуктивных органов у животных.

Результаты и обсуждения: После ХТ у всех мышей достоверно снижался вес, эстральный цикл становился монофазным, вагинальных пробок не было. Во 2 группе животных без лечения вес и активность восстанавливались через 6 недель после ХТ, эстральный цикл через 5 недель у 40%, половая активность — через 6 недель у 30% животных. В 3 группе животных, вес и активность восстанавливались через 3 недели, эстральный цикл у 70% — через 4 недели, половая активность — через 5 недель. В 4 группе животных, после применения МСК ЖТ, вес и активность восстанавливались через 3 недели, эстральный цикл у 85% — через 4 недели, половая активность — через 5 недель. При гистологическом исследовании у 2 группы животных яичники были уменьшены в размерах, отмечалось отсутствие структурных элементов, а в матках имелись атрофические изменения. В группах животных с лечением КП и МСК ЖТ отмечалось отсутствие типичных элементов в яичниках, наблюдались отдельные фолликулоподобные структуры, матка в препаратах была близка к интактной.

Выводы: В эксперименте КП и МСК ЖТ оказывает выраженный терапевтический эффект при индуцированном ХТ ПНЯ.

Ключевые слова: Осложнения после химиотерапии, преждевременная недостаточность яичников, криоэкстракт плаценты, мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани

Преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ) наблюдается у 1% женщин до 40 лет и 0,1% до 30 лет, из которых 37% обусловлено ятрогенными причинами (в основном после лечение онкопатологии), 25% - идиопатическими, 19% - генетическими и 19% - аутоимунными. Данная патология является частым последствием применения химиотерапии (ХТ), ПНЯ длится от нескольких месяцев до 3 лет у женщин до 35 лет и считается необратимой у пациенток старше 40 лет [7]. При проведении ХТ по поводу злокачественных новообразований в детстве ПНЯ развивается у 6,3% – 8% пациенток. В группе девочек, получивших алкилирующие препараты, доля пациенток с ПНЯ увеличивается до 30% [4]. Цитостатическая терапия, подавляя функцию яичников, существенно влияет и на характер менструального цикла. Так, у женщин моложе 25 лет, получавших в качестве первичного лечения стандартную ХТ с включением алкилирующих препаратов, аменорея возникает в 28% случаев, у женщин старше 25 лет — в 86% и у пациенток старше 40 лет — почти в 100% наблюдений [3].

Предполагается, что под воздействием ХТ фолликулы, вступившие в фазу роста или находящиеся в ранней фазе стимуляции гипофизом, подвергаются атрезии. В результате атрезии фолликулов снижается секреция эстрадиола и ингибина В, что, в свою очередь, ведет к повышению концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) вследствие отрицательной обратной связи. Повышенный уровень ФСГ вызывает избыточное образование фолликулов и дальнейшую их гибель под воздействием химиопрепаратов. Более того, сохранение менструальной функции после ХТ еще не означает, что яичники не повреждены. Частичная потеря резерва примордиальных фолликулов может привести к ранней менопаузе (отсроченная реакция на лечение). Таким образом, после применения противоопухолевых препаратов, необходима тщательная оценка гормональных и биофизических параметров яичника даже у женщин с нормальной менструальной функцией [1].

Осложнениями ПНЯ являются не только отсутствие фертильности, снижение либидо и аменорея, но и психоэмоциональные расстройства, ухудшение качества жизни, остеопороз, рост смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы и инсультов. Традиционная

гормонотерапия требует постоянного приёма, имеет ряд ограничений не обеспечивает восстановления фертильности и коррекции патологических изменений органов мишеней [2]. К одним из перспективных методов коррекции ПНЯ относят клеточную и тканевую терапию [9]. Плацентарные клетки и препараты из плаценты обеспечивают развитие структур de novo и адекватную перестройку существующих тканей несколькими инструментами. В первую очередь, плацентарными факторами роста разных классов, высоким уровнем анаболических процессов, а также регуляцией процессов апоптоза. Плацентарные клетки активно продуцируют проапоптотические сигналы: TNF, LT, FasL, TRAIL, TWEAK, LIGHT, собственно иницируют и активируют апоптоз. Поглощение плацентарными макрофагами апоптотических клеток приводит к угнетению медиаторов воспаления и индукции противовоспалительных цитокинов [6]. Экстракты плаценты человека из-за высокого содержания в них биологически активных веществ таких как белки, пептиды, РНК, ДНК, полидезоксирибонуклеотиды, аминокислоты, ферменты, микроэлементы проявляют антиоксидантную, противовоспалительную, тромболитическую активность, а также являются стимулирующим агентом репарации тканей [8]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) экспрессируют широкий спектр молекул клеточной адгезии, рецепторов ростовых факторов, которые имеют значение в осуществлении клеточного взаимодействия и хоуминга. МСК проявляют высокую экспрессию интегринов $\alpha 1, \alpha 5$ и $\beta 1 (CD29)$; низкую экспрессию $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 6, \alpha V, V2$ и $V4$ и не экспрессируют $\alpha 4, \alpha L$ и $\beta 2$. Эти данные указывают на ключевые механизмы взаимодействия МСК с другими типами клеток, при их системном введении, МСК выборочно репопулируют в области тканевого повреждения независимо от типа ткани. Вместе с тем, МСК обладают иммуномодулирующим эффектом и *in vitro* способны подавлять пролиферацию активированных лимфоцитов и функциональную активность зрелых Т-клеток.

Учитывая, что жировая ткань в значительных количествах (до 300 мл и более) может быть получена под местной анестезией при сравнительно малоболезненной косметической липосакции, липоаспирации подкожного жира или путем эксцизии жировых отложений, эта ткань может явиться альтернативным костному мозгу источником МСК для трансплантации и тканевой инженерии [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнить терапевтические эффекты криоэкстракта плаценты (КП) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в восстановлении половой функции у мышей при овариальной недостаточности после ХТ в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ПНЯ моделировали на самках мышей линии BALB/c, возрастом 6 месяцев, по методу [11], введением бусульфана и циклофосамида. Использовали 4 группы по 15 самок весом $20,1 \pm 1,1$ г с регулярным эстральным циклом: 1—контрольная группа, 2—группа с моделью ПНЯ, 3—группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение КП (по 0,01 г в/м 1 р/сут 5 дней). 4—группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение МСК ЖТ (100000 клеток внутривнутрибрюшинно однократно). МСК жировой ткани получали по методу [10] с использованием ферментативной обработки коллагеназой. Лечение начинали через 2 недели после ХТ.

Исследовали вес, эстральный цикл, половую активность, морфологические изменения препаратов яичников, маток исследуемых животных через 12 недель после ХТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

В течение 6 недель вес у животных контрольной группы оставался в пределах 21,8 - 22,4 г. После ХТ у всех групп вес достоверно снизился до 17,1 г с последующим медленным восстановлением. Также в это время отмечалось ухудшение общего состояния – гиподинамию, мутность глаз. Во 2 группе животных, без лечения, мыши восстанавливали вес на 6-ю неделю эксперимента. В 3 группе мышей, которой вводили КП вес восстанавливался на 3 неделю после ХТ, у 4 группы животных, которые получали МСК ЖТ – на 3 неделю после ХТ. Динамика изменения веса мышей 1-4 групп представлены на рис.1.

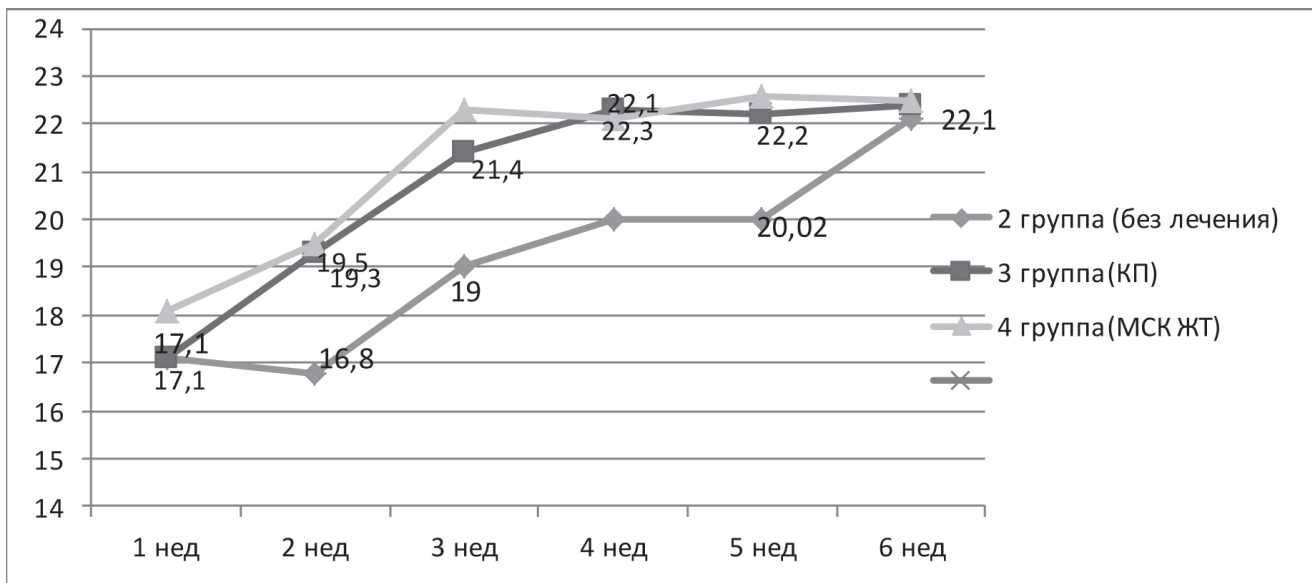


Рис.1. Динамика изменения веса мышей

Одновременно с восстановлением веса улучшалось общее состояние и вид животных.

Количество эстральных циклов у животных 1-4 групп исследовали методом вагинальных мазков. В 1 группе у всех мышей наблюдали регулярный цикл. У животных 2 группы эстральный цикл становился монофазным, к 5 неделе эстральный цикл восстановился у 40% мышей. В 3 группе эстральный цикл восстанавливался к 4 неделе у 70% мышей. В 4 группе - к 4 неделе эстральный цикл восстанавливался у 85%

животных. Восстановление эстральных циклов у животных 1-4 групп представлено на рис.2

Изучение половой функции у животных 1-4 групп показало, что количество эффективных спариваний во 2 группе после ХТ составило 30% на 6 неделе. Этот показатель повышался до 60-80% при использовании различных методов терапии.

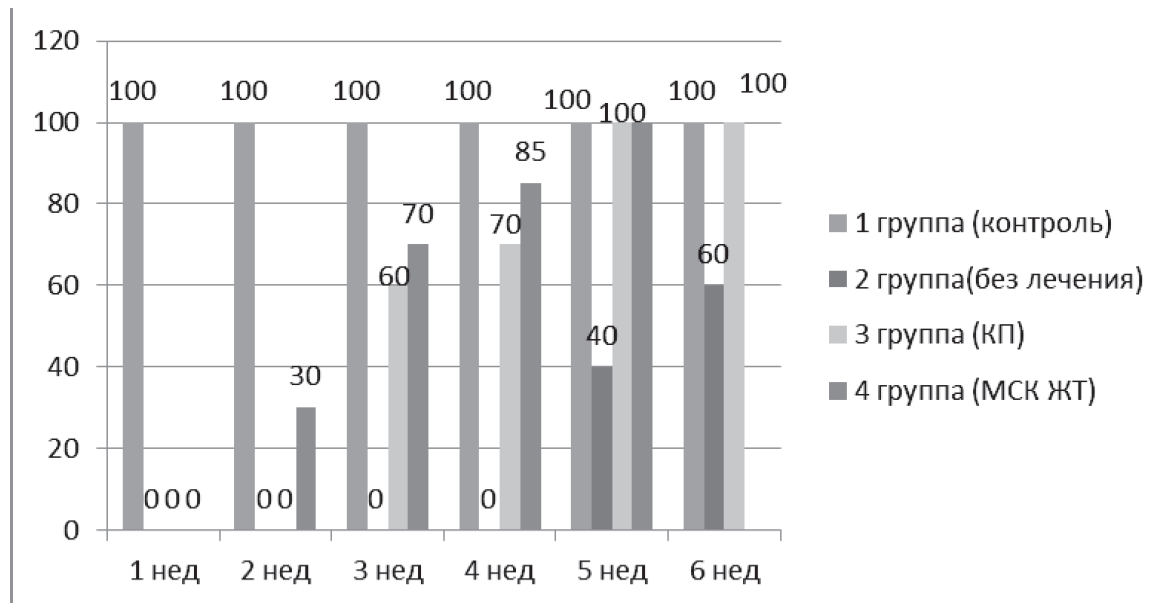


Рис.2. Динамика восстановления эстрального цикла у мышей

При исследовании репродуктивной функции у 90% самок 1 группы беременность наступила на протяжении эксперимента, среднее количество плодов – 12. Ни одна из самок после ХТ не забеременела. По литературным данным для данной модели описано восстановление фертильности в случае введения МСК непосредственно в яичник.

Во 2 группе животных через 12 недель при выведении мышей из эксперимента наблюдали

резкое увеличение жировой ткани в брюшной полости. Яичники были уменьшены в размерах, при гистологическом исследовании отмечено отсутствие их структурных элементов, а именно: жёлтых тел, примордиальных, первичных, вторичных фолликулов, строма заполнена крупными клетками. Данные изменения представлены на Рис. 3,1. При гистологическом исследовании маток наблюдали атрофические явления (Рис.3,2).

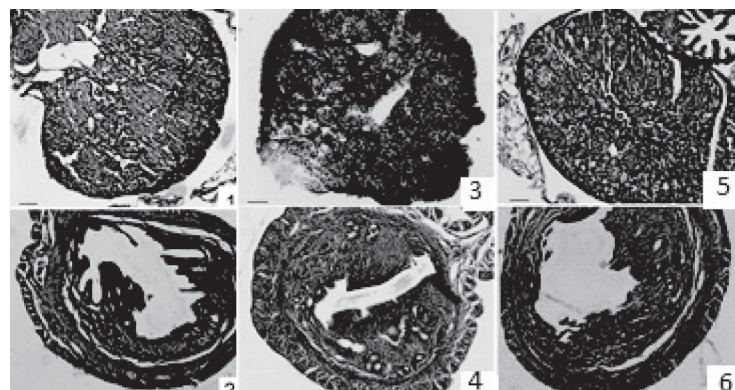


Рис 3. Морфологические изменения в органах исследуемых животных через 12 недель после ХТ: 1-2 - группа 2(без лечения); 3-4- группа 3 (КП); 5-6 группа 4 (МСК ЖТ) , линейки 100 мкм.

У 3 группы животных в яичниках отсутствовали типичные элементы, наблюдались отдельные фолликулоподобные структуры (Рис.3, 3), матка близка к интактной (Рис.3,4).

У 4 группе в яичниках не было типичных элементов, отмечалась гиперплазия отдельных клеток или групп клеток (Рис.3, 4). Структура маток была близка к нативной, все слои и железы выражены (Рис.3,5).

ВЫВОДЫ

Применение КП и МСК ЖТ оказывает выраженный терапевтический эффект в лечении овариальной недостаточности, индуцированной ХТ.

При нетопическом введении КП и МСК ЖТ возможно восстановление половой функции мышей, но не их фертильности.

Разработанный в эксперименте метод коррекции ПНЯ, может использоваться для восстановления репродуктивного здоровья женщин с ПНЯ после ХТ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Волочаева М.В., Р.Г. Шмаков, Е.А. Демина / Влияние противоопухолевого лечения на репродуктивную систему женщин: методы защиты и сохранения функции яичников // Клиническая Онкогематология.-2014.-№2.-том7.-С.114-121.
2. Козуб М.Н. Реалии и перспективы использования клеточной и тканевой терапии в лечении преждевременной недостаточности яичников (обзор литературы) / Козуб М.Н., Скибина К.П., Козуб Н.И., Прокопюк В.Ю. //Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України Випуск 1 (39).- 2017.-С.70-75.
3. Козуб М.М. Експериментальне обґрунтування застосування кріоекстракту плаценти у пацієнток з синдромом передчасної недостатності яєчників / М.М. Козуб, М.І. Козуб, К.П. Скибіна // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупіка. Випуск 27 ч.І. Київ. – 2016. – С.117– 123.
4. Нечушкина И.В. / Репродуктивное здоровье женщин, излеченных в детстве от злокачественных опухолей // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2011. – т. 2. – №4.
5. Петренко А.Ю., Хунов Ю.А., Иванов Э.Н. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения. - Луганск: Пресс-экспресс, 2011. - 368 с.
6. Прокопюк О.С. Кріоконсервування плаценти та визначення механізмів її впливу на організм реципієнтів пізнього онтогенезу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук: спец. 14.01.35 «Кріомедицина» / О.С.Прокопюк. - Харків, 2014 - 36 с.
7. Троик Е.Б. Репродуктивное здоровье и беременность у больных с лимфомами Ходжкина / Е. Б. Троик , Л. Э. Кокаева , И. В. Сергеева , Т. В. Шнейдер // Детская медицина Северо-Запада .– 2012.– Т. 3 № 3.– с.46– 48
8. Шепітько К.В. Морфометрична характеристика стінки клубової кишки при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного запалення черевної порожнини у щурів/ К.В. Шепітько // Світ медицини та біології. – 2014 - №3(45) – С.158 – 161.
9. Kozub M.M. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure / Kozub M.M., Prokopiuk V.Y., Skibina K.P., Prokopiuk O.V., Kozub N.I. // Experimental oncology.-2017.- Vol. 39, № 3.-181-185.
10. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, Yao Y. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. Stem Cell Res Ther. 2013 Jul 9;4(4):80. doi: 10.1186/scrt231.
11. Xiao GY1, Liu IH2, Cheng CC1, Chang CC1, Lee YH3, Cheng WT4, Wu SC5. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. PLoS One. 2014 Sep 8;9(9):e106538. doi: 10.1371/journal.pone.0106538. eCollection 2014.

РЕЗЮМЕ

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЕФЕКТІВ КРІОЕКСТРАКТА ПЛАЦЕНТИ І МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ У ЛІКУВАННІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ, ВИКЛИКАНИХ ХІМІОТЕРАПІЄЮ, В ЕКСПЕРИМЕНТІ

СКИБИН К.П., КОЗУБ Н.І.,
ПРОКОПЮК В.Ю.

Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) є частим наслідком лікування онкологічних захворювань. У даний час актуальним завданням є пошук нових способів відновлення і збереження функції яєчників у жінок, що перенесли хіміотерапію (ХТ). **Мета дослідження:** порівняти терапевтичні ефекти кріоекстракту плаценти (КП) та мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини (МСК ЖТ) у відновленні статеві функції при оваріальній недостатності після ХТ в експерименті. **Матеріали та методи:** ПНЯ моделювали на самках мишей лінії BALB \ с. Тварин розподілили на 4 групи по 15 самок вагою $20,1 \pm 1,1$ г з регулярним естральним циклом: 1 - контрольна група, 2 - група з моделлю ПНЯ, 3 - група з моделлю ПНЯ, отримувала лікування КП (по 0,01 г в / м 1 р / сут 5 днів). 4 група з моделлю ПНЯ, що отримувала лікування МСК ЖТ (100000 клітин внутрішньочеревно одноразово). Досліджували вагу, естральний цикл, статеву активність, морфологічні зміни репродуктивних органів у тварин. **Результати та обговорення:** Після ХТ у всіх мишей достовірно знижувалась вага, естральний цикл ставав монофазним, вагінальних пробок не було. У 2 групі тварин без

лікування вага і активність відновлювалися через 6 тижнів після ХТ, естральний цикл - через 5 тижнів у 40%, статевая активність - через 6 тижнів у 30% тварин. У 3 групі тварин, вага і активність відновлювалися через 3 тижні, естральний цикл у 70% -через 4 тижні, статевая активність - через 5 тижнів. В 4 групі тварин, після застосування МСК ЖТ, вага і активність відновлювалися через 3 тижні, естральний цикл у 85% - через 4 тижні, статевая активність - через 5 тижнів. При гістологічному дослідженні у 2 групи тварин яєчники були зменшені в розмірах, зазначалося відсутність структурних елементів, а в матках були атрофічні зміни. У групах тварин з лікуванням КП і МСК ЖТ відзначалось відсутність типових елементів в яєчниках, спостерігались окремі фоллікулоподібні структури, матка в препаратах була близька до інтактної. **Висновки:** В експерименті КП і МСК ЖТ має виражений терапевтичний ефект при індукованому ХТ ПНЯ.

Ключові слова: Ускладнення після хіміотерапії, передчасна недостатність яєчників, криоекстракт плаценти, мезенхімальні стовбурові клітини з жирової тканини.

SUMMARY

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THERAPEUTIC EFFECTS OF CRYOEXTRACT PLACENTA AND MESENCHYMAL STEM CELLS OF FATTY TISSUE IN TREATMENT OF PREMATURE FAILURE OF OVARIES CAUSED BY CHEMOTHERAPY IN EXPERIMENT SKIBIN KP, KOZUB NI, PROKOPYUK V.Yu.

Premature ovarian failure (POF) is a common consequence for woman after treatment of oncological diseases. Nowadays the actual task is to find new methods to restore and preserve the ovarian function in women after chemotherapy

(CT). **The aim** of the research was to compare the therapeutic effects of cryoextract of placenta (CP) and mesenchymal stem cells of adipose tissue (MSCs AT) in restoring the sexual function in POF after CT in the experiment. **Materials and methods:** POF was modeled on female BALB \ c mice. Animals were divided into 4 groups of 15 females with a weight of 20.1 ± 1.1 g with a regular estrous cycle: 1 – intact group, 2 - group with modeled POF, 3 - group with modeled POF and treated with CP (0.01 g in / m 1 p / day for 5 days). 4-group with modeled POF and treated with MSCs AT (100,000 cells intraperitoneally at once). We studied the weight, estrous cycle, sexual activity, morphological changes in the reproductive organs in animals. **Results and discussion:** After CT weight was reliably reduced in all mice, the estrous cycle became monophasic, there were no vaginal plugs. In the 2nd group of animals, without treatment, weight and activity were restored at 6 weeks after CT, the estrus cycle - after 5 weeks in 40% of animals, sexual activity in 6 weeks in 30% of mice. In 3 group of animals, weight and activity were restored after 3 weeks, estrous cycle in 70% animals after 4 weeks, sexual activity - in 5 weeks. In 4 group of animals treated with MSCs AT, weight and activity were restored after 3 weeks, the estrous cycle in 85% mice after 4 weeks, sexual activity - after 5 weeks. Histological examination indicated: in 2 group of animals ovaries were reduced in size and structural elements in them were absence. In uteri there were atrophic changes. In groups of animals treated with CP and MSCs AT, there were lack of typical elements in ovaries, separate follicle-like structures were observed, the structure of uteri was close to intact. **Conclusions:** In the experiment KP and MSCs AT efficacy when treating the POF, induced by CT.

Keywords: Complications after chemotherapy, premature ovarian failure, cryoextract of placenta, mesenchymal stem cells of adipose tissue.