

УДК 611.018.2/6:615.014.41:618.11-002.2

Н.О. Волкова*, М.С. Юхта, Л.В. Степанюк, Л.Г. Чернишенко

Кріоконсервовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини у відновленні фертильності тварин із хронічним запаленням яєчників

UDC 611.018.2/6:615.014.41:618.11-002.2

N.O. Volkova*, M.S. Yukhta, L.V. Stepanyuk, L.G. Chernyshenko

Cryopreserved Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Restore Fertility in Animals with Chronic Inflammation of Ovaries

Реферат: У роботі досліджено вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку за умов внутрішньовенного введення окремо та у комбінації з «Тималіном» (комплекс імунорегуляторних пептидів із тимуса великої рогатої худоби) на фертильність мишей із хронічним запаленням яєчників. За контроль брали тварин, яким вводили фізіологічний розчин. Встановлено, що внутрішньовенне введення кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин окремо та у комбінації з «Тималіном» мишам із хронічним запаленням яєчників на 21-шу добу сприяло збільшенню відносної кількості запліднених яйцеклітин під час суперовуляції (на 38 та 33% відповідно), частоти настання вагітності у природному естральному циклі (на 20 та 23% відповідно) та середньої величини послідів (на 98 та 83% відповідно) порівняно з показниками контрольних тварин. Застосування «Тималіну» окремо значуще не впливало на показники. Різниця маси тіла мишенят у дослідній та контрольній групах відмічалася лише на ранніх строках спостереження, а на 15-ту добу вона нівелювалася.

Ключові слова: фертильність, хронічне запалення, яєчники, кріоконсервування, кістковий мозок, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини.

Реферат: В работе исследовано влияние кріоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при внутривенном введении отдельно и в комбинации с «Тималином» (комплекс иммунорегуляторных пептидов из тимуса крупного рогатого скота) на фертильность мышей с хроническим воспалением яичников. За контроль брали животных, которым вводили физиологический раствор. Установлено, что введение кріоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга отдельно и в комбинации с «Тималином» мышам с хроническим воспалением яичников на 21-е сутки способствовало увеличению относительного количества оплодотворенных яйцеклеток при суперовуляции (на 38 и 33% соответственно), частоты наступления беременности в естественном эстральном цикле (на 20 и 23% соответственно) и средней величины пометов (на 98 и 83% соответственно) по сравнению с показателями контрольных животных. Применение «Тималина» отдельно значимо не влияло на исследованные показатели. Разница массы тела мышат в экспериментальной и контрольной группах отмечалась только на ранних сроках наблюдения, а на 15-е сутки наблюдения она нивелировалась.

Ключевые слова: фертильность, хроническое воспаление, яичники, кріоконсервирование, костный мозг, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

Abstract: The paper describes the influence of multipotent cryopreserved mesenchymal stromal bone marrow cells under conditions of intravenous administration alone and in combination with 'Thymalinum' (immune regulatory peptide complex from cattle thymus) on the fertility of mice with chronic inflammation of ovaries. The animals injected with a physiological saline were assumed as the control. To the day 21 following intravenous injection of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells alone and in combination with 'Thymalinum' to the mice with chronic inflammation of ovaries an increase in a relative number of fertilized ova during superovulation (38 and 33%, respectively) was found, as well as in a pregnancy rate in natural estrous cycle (20 and 23% respectively) and the average litter number (98 and 83%, respectively) compared to the control animals. 'Thymalinum' application *per se* did not affect significantly the studied indices. The difference in body weight between the mice of experimental and control groups was observed only at early terms of observation, and to the day 15 it disappeared.

Key words: fertility, chronic inflammation, ovaries, cryopreservation, bone marrow, multipotent mesenchymal stromal cells.

Основна причина порушення репродуктивної функції у жінок – запалення органів малого таза. Хронічне запалення яєчників є частим захворюванням, яке може супроводжуватися різними гінекологічними патологіями. За даними МОЗ України

The main cause of disorders in reproductive function in women is pelvic inflammation. Chronic inflammation of ovaries is a common disease, which could be accompanied by various gynecological pathologies. According to the Ministry of Health Care of Ukraine data

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: volkovanatali2006@yandex.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: volkovanatali2006@yandex.ua

Надійшла 09.11.2015

Прийнята до друку 01.12.2015

Received November, 11, 2015

Accepted December, 01, 2015

частота запалень органів малого тазу досягає 60–65% від загальної кількості гінекологічних патологій [8]. Довготривалий та рецидивний перебіг цього захворювання може призводити до безпліддя у 60% випадків [6].

Не викликає сумніву, що розробка нових підходів до лікування жіночого безпліддя, у тому числі асоційованого з хронічними запальними процесами у внутрішніх статевих органах, є актуальним завданням сучасної медицини. Слід зазначити, що хронічне запалення зумовлене первинним імунodefіцитом, що провокує перехід гострого запального процесу в хронічну стадію. У той же час тривалий запальний процес приводить до зниження імунологічної реактивності організму, зміненню цитокінового профілю, що обумовлює статистично значуще зниження результативності лікування [5]. Під час вибору схем лікування хронічного запалення яєчників використовують імунomodуючі препарати. Зокрема, у нашому дослідженні був використаний «Тималін» (ВАТ «Біофарма», Україна) – комплекс імунорегуляторних пептидів, екстрагованих із тимуса великої рогатої худоби, який здійснює стимулюючий вплив на клітинний імунітет, процеси фагоцитозу та продукцію цитокінів. Результати аналізу літератури свідчать про актуальність вивчення можливості покращення репродуктивної функції людини та тварин за допомогою кріоконсервованих клітинних препаратів. Так, наприклад, введення кріоекстракту плаценти самкам мишей із синдромом реактивного запалення яєчників має виражену терапевтичну дію та сприяє ефективнішій індукції суперовуляції під впливом екзогенних гонадотропних гормонів [4].

Важливе значення має вивчення корекції імунної та гормональної дисфункції людини та тварин за допомогою препаратів, до складу яких входять мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) [17, 20, 23]. Незважаючи на те, що первинний інтерес до ММСК пов'язаний із потенційною здатністю до регенерації тканин, відкриття їх імунomodуючих властивостей дозволяє розширити напрямки клінічного застосування. Під час активації сигналами запального мікрооточення ММСК здатні комплексно впливати на клітини імунної системи за допомогою контактних і гуморальних механізмів та опосередковано коригувати протікання запального процесу [21].

У попередніх роботах [3, 22] показано, що внутрішньовенне введення кріоконсервованих ММСК (кММСК) кісткового мозку тваринам із хронічним запаленням яєчників чинить модулюючу дію на перебіг запалення та сприяє відновленню фолікулогенезу без генерації процесів апоптозу в ооцитах. Однак залишається відкритим питання

the incidence of inflammation of pelvic organs reaches 60–65% of all the gynecological pathologies [14]. Long-term and recurrent course of this disease can lead to infertility in 60% of cases [4].

There is no doubt that the development of new approaches to treat female infertilities, including those associated with chronic inflammation of internal genitals, is an urgent task of current medicine. It should be noted that chronic inflammation is caused largely by primary immune deficiency and provokes a transition of an acute inflammation into a chronic phase. At the same time, a long-lasting inflammation leads to a reduced immunological reactivity of an organism, and modification of cytokine profile, which stipulates a statistically significant reduction in the treatment efficiency [3]. The protocols of ovarian chronic inflammation treatment involve immune modulating drugs. In particular, in the present study we used 'Thymalinum' (Biofarma, Ukraine), representing the complex of immune regulatory peptides extracted from the cattle thymus, possessing a stimulating effect on a cell immunity, processes of phagocytosis and production of cytokines. Analysis of the reported data testified the relevance of exploring the possible improving of human and animal reproductive function using the cryopreserved cell preparations. For example, the introduction of placenta cryoextract to female mice with syndrome of ovarian reactive inflammation had a pronounced therapeutic effect and promoted more effective induction of the superovulation influenced by exogenous gonadotropin hormones [6].

No less important is the study of correction of immune and hormonal dysfunction of humans and animals using the medical products, comprising the multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) [11, 18, 23]. Despite the fact that the primary interest to the MMSCs was associated with the potential ability to tissue regeneration, exploring their immune modulatory properties could extend the areas of clinical application. Signals of inflammatory microenvironment activate the MMSCs which affect diversely the cells of immune system through the contact or humoral mechanisms and thus indirectly correct the inflammation course [19].

Previous papers [21, 22] demonstrated that an intravenous injection of cryopreserved MMSCs (cMMSCs) of bone marrow to the animals with chronic inflammation of the ovaries had a modulating effect on the course of inflammation and helped to restore a follicle genesis without initiation of apoptosis in oocytes. However, there is still a question about the influence of cell therapy on fertility, which is reduced during chronic inflammation, as well as the possible use of cMMSCs for the combined therapy of chronic inflammation of the ovaries.



щодо впливу клітинної терапії на фертильність, яка знижена на тлі хронічного запалення, а також можливість використання кММСК для комплексної терапії хронічного запалення яєчників.

Метою даної роботи було дослідження впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на фертильність тварин із хронічним запаленням яєчників при внутрішньовенному введенні окремо та у комбінації з «Тималіном».

Матеріали та методи

Усі маніпуляції здійснювали відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом із біоетики (Київ, 2013) та норм Комісії з біоетики ІПКіК НАН України. Всі тварини до початку та в процесі дослідження перебували в умовах віварію на звичайному харчовому раціоні.

У роботі використовували ММСК кісткового мозку мишей ($n = 5$), які отримували зі стегнових кісток. Клітини виділяли шляхом вимивання за допомогою розчину Хенкса («РАА», Австрія) з наступним пропусканням крізь голки з поступово зменшуваним діаметром. Наступний етап включав центрифугування при 1500 об/хв (834g) протягом 5 хв. Отриману суспензію клітин ресуспендували в живильному середовищі та висівали зі щільністю 10^3 кл/см² у культуральні флакони («РАА»). Живильне середовище культивування містило: середовище IMDM («РАА»), 10% ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби («HyClone», США), 150 мкг/мл «Гентаміцину» («Фармак», Україна) та 10 мкг/мл «Амфотеріцину Б» («РАА»). Живильне середовище змінювали кожні три доби. Клітини культивували у стандартних умовах при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Після утворення моношару культури пасивували.

Кріоконсервування культур здійснювали під захистом 10% ДМСО («РАА») з додаванням 20% ЕС на живильному середовищі. Отриману суспензію поміщали по 1 мл у кріопробірки («Nunc», США). Охолодження зразків проводили зі швидкістю 1 град/хв до -80°C у парах рідкого азоту в умовах кріосховища з подальшим зануренням у рідкий азот [2]. Зразки зберігали в умовах низькотемпературного банку протягом 4 місяців, відігрівали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази. Кріопротектор видаляли повільним додаванням надлишкового (1:9) об'єму розчину Хенкса («РАА») з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв (834g) протягом 5 хв. Цілісність мембрани клітин оціню-

The aim of this research was to study the influence of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow on the fertility of animals with chronic inflammation of the ovaries during an intravenous administration *per se* and in combination with 'Thymalinum'.

Materials and methods

All the manipulations with animals were carried out in accordance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress of Bioethics (Kyiv, 2013) and regulations of the Commission in Bioethics of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine. All the animals before and during the study were under the animals' house conditions with a standard diet.

The research was performed in murine bone marrow MMSCs ($n = 5$) derived from the femur bones. The cells were isolated by washing-out with Hanks solution (PAA, Austria), followed with a passage through a needle with a gradually decreasing diameter. The next stage included the centrifugation at 1,500 rpm (834g) for 5 min. The resulted cell suspension was re-suspended in culture medium and plated with the density of 10^3 cells/cm² in culture flasks (PAA). The nutrient culture medium contained: IMDM (PAA), 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, USA), Gentamicin (150 µg/ml) (Farmak, Ukraine) and Amphotericin B (10 µg/ml) (PAA). Nutrient medium was changed every three days. The cells were cultured under standard conditions at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The cultures were passaged after the formation of monolayer.

The cultures were cryopreserved under the protection of 10% DMSO (PAA) supplemented with 20% FBS in culture medium. The resulted suspension was placed into 1 ml cryovial (Nunc, USA). The samples were cooled at a rate of 1 deg/min down to -80°C in liquid nitrogen vapors in a cryotank, and then immersed into liquid nitrogen [20]. The samples were stored under conditions of low temperature bank over 4 months, then thawed in a water bath at 40°C till the appearance of a liquid phase. Cryoprotective agents were removed by slow addition of excessive (1:9) volume of Hanks solution (PAA) followed by centrifugation at 1,500 rpm (834g) for 5 min. The integrity of cell membranes was evaluated by the test of Trypan blue supravital dye exclusion (Sigma, USA).

Experimental animals were 100 mature outbred female white mice weighing of 18–20 g. In order to simulate a chronic inflammation of the ovaries the mice were once intraperitoneally injected with inactivated



вали за тестом на виключення суправітального барвника трипанового синього («Sigma», США).

У якості експериментальних тварин було використано 100 безпорідних статевозрілих білих мишей-самок із масою тіла 18–20 г. Із метою виклику хронічного запалення яєчників мишам одноразово внутрішньочеревинно вводили інактивовану вакцину *Staphylococcus aureus* штам 209 (50×10^6 мікробних тіл у 0,3 мл фізіологічного розчину на тварину), після чого мишей тримали в умовах віварію 21 добу без лікування.

Для отримання вакцини готували добову культуру *S. aureus* за стандартним методом [7], яку змивали з агару 5 мл фізіологічного розчину, визначали титр методом стандартних розведень та інкубували за температури 75°C протягом години. Після інкубації суспензію клітин розводили до необхідної концентрації та використовували в експерименті.

На 22-гу добу з моменту введення інактивованої вакцини *S. aureus* тварин розділили на групи: контрольна група – з внутрішньовенним введенням фізіологічного розчину (0,2 мл); дослідна група 1 – з п'ятикратним підшкірним введенням 0,25 мг «Тималіну» з інтервалом у добу; дослідна група 2 – з одноразовим внутрішньовенним введенням кММСК кісткового мозку ($0,5 \times 10^5$ життєздатних клітин у 0,2 мл розчину Хенкса на тварину); дослідна група 3 – з одноразовим внутрішньовенним введенням кММСК кісткового мозку ($0,5 \times 10^5$ життєздатних клітин у 0,2 мл розчину Хенкса на тварину) у комбінації з п'ятиразовим підшкірним введенням 0,25 мг «Тималіну» з інтервалом у добу. Дозу «Тималіну» розраховували за методом дозування речовин для ссавців із урахуванням констант біологічної активності та коефіцієнта видової стійкості. Також була сформована група інтактних тварин аналогічної маси та віку.

На 21-шу добу від початку терапії у мишей викликали суперовуляцію за стандартною схемою [1]: внутрішньом'язово вводили 5 МО гонадотропіну сироватки жеребних кобил («Intervet», Нідерланди) та з інтервалом 46–48 годин 7,5 МО людського хоріонічного гонадотропіну («Organon», Нідерланди). Одразу після ін'єкції людського хоріонічного гонадотропіну самок підсаджували до фертильних самців тієї ж лінії на ніч. Факт спарювання встановлювали за наявністю копулятивної пробки. Ооцити/ембріони отримували не раніше ніж через 48 годин після ін'єкції людського хоріонічного гонадотропіну з відпрепарованих яйцеводів піддослідних тварин, тричі відмивали в середовищі Дюльбекко з додаванням 10% ЕС при $35\text{...}37^\circ\text{C}$ та підраховували загальну кількість ооцитів/ембріонів.

vaccine of *Staphylococcus aureus* strain 209 (50×10^6 microbial bodies in 0.3 ml saline per animal) after which the mice were kept under animals house conditions 21 days without any treatment.

To obtain the vaccines a daily *S. aureus* culture was prepared by standard method [5], which was washed-off from agar with 5 ml saline, the titer was determined by standard dilution and incubated at 75°C for one hour. Following incubation, the cell suspension was diluted to the desired concentration and used in the experiment.

To day 22 from the moment of introduction of inactivated *S. aureus* vaccine the animals were separated into groups: the control group represented an intravenous injection of saline (0.2 mL); experimental group 1 had the five-fold subcutaneous introduction of 0.25 mg 'Thymalinum' (JSC 'Biofarma', Ukraine) with one day interval; experimental group 2 animals were once intravenously injected with bone marrow cMMSCs (0.5×10^5 of viable cells in 0.2 ml Hanks solution per animal); experimental group 3 had a single intravenous injection of bone marrow cMMSCs (0.5×10^5 of viable cells in 0.2 ml Hanks solution per animal) in combination with five-fold subcutaneous administration of 0.25 mg 'Thymalinum' with one day interval. Dose of 'Thymalinum' was counted by the method of the dose proportion of substances for mammals, taking into account biological activity constants and coefficient of species sustainability. In addition, there was formed the group of intact animals of similar weight and age.

To day 21 following the therapy start a superovulation was provoked in mice according to the standard procedure [13]: 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (Intervet, the Netherlands) and 7.5 IU human chorionic gonadotropin (Organon, the Netherlands) with an interval of 46–48 hrs were intramuscularly injected. Just after the injection of human chorionic gonadotropin the females were placed overnight with fertile males of the same line. The fact of occurred mating was established by the presence of copulation plugs. Oocytes/embryos were obtained not earlier than 48 hrs later the injection of human chorionic gonadotropin from the prepared oviducts of experimental animals, thrice washed in Dulbecco medium supplemented with 10% FBS at $35\text{...}37^\circ\text{C}$ and total number of oocytes/embryos was counted.

To perform fertilization in natural estrous cycle each female in 21 days from the beginning of therapy was placed to a fertile male for the period of 5 days (1 estrous cycle). The frequency of fertilization was calculated as the ratio of females which became pregnant in each series of experiments to the total number of placed animals in the group multiplied by 100%. After birth of pups their average number was



Для запліднення у природному естральному циклі кожену самку через 21 добу від початку терапії підсаджували до фертильного самця терміном на 5 діб (1 естральний цикл). Частоту запліднення розраховували як співвідношення кількості самок, які завагітніли у кожній серії експериментів, до загальної кількості підсаджених тварин у групі помножене на 100%. Після народження мишенят визначали їхню середню кількість на 1 самку, обчислювали виживаність з 0 по 5-ту добу життя (відношення числа мишенят, які дожили до 5-ї доби, до народжених живими) та оцінювали динаміку маси тіла протягом 15 діб життя.

Під час статистичної обробки результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз, t-критерій Стюдента та програму «Statistica 8» («StatSoft», США). Критичний рівень значущості дорівнював 0,05. Результати представлені у вигляді середніх значень та їх похибок ($M \pm m$).

Результати та обговорення

Першим етапом дослідження була проведена порівняльна оцінка кількості ембріонів і незапліднених ооцитів після циклу гормональної стимуляції яєчників. Під час запліднення самок за умов супер-овуляції було визначено, що у інтактних тварин відносна кількість запліднених яйцеклітин, що розвивалися до стадії двоклітинних ембріонів, складала $(98,8 \pm 0,7)\%$ (рис. 1). У групі контролю з введенням фізіологічного розчину цей показник не перевищував $(56,5 \pm 5,5)\%$. У тварин із терапією «Тималіном» спостерігали тенденцію до збільшення кількості запліднених яйцеклітин $(61,4 \pm 7,1)\%$ порівняно з контрольною групою, але ця різниця була статистично незначущою. Найкращі показники були отримані у дослідних групах із введенням кММСК окремо та у комбінації з «Тималіном» (відносна кількість запліднених яйцеклітин, що розвивалися до стадії двоклітинних ембріонів, була значуще вищою від контролю та складала $(77,9 \pm 6,3)$ та $(75,3 \pm 4,9)\%$ відповідно). Виходячи з вищеведеного, можна стверджувати про зниження відповіді яєчників тварин із хронічним запаленням яєчників на гормональну стимуляцію. Клітинна терапія сприяла відновленню оваріального резерву та збільшенню відносної кількості ембріонів за умов супер-овуляції.

Схожа тенденція спостерігалася й у серіях експериментів із заплідненням самок у природному естральному циклі. Частота настання вагітності у інтактних тварин у середньому складала $(86,6 \pm 5,4)\%$ (рис. 2), що знаходиться у межах норми для мишей даного віку [14]. На фоні хронічного запалення яєчників та введення фізіологічного розчину або «Тималіну» частота настання вагітності у природному естральному циклі знижувалася порівняно з

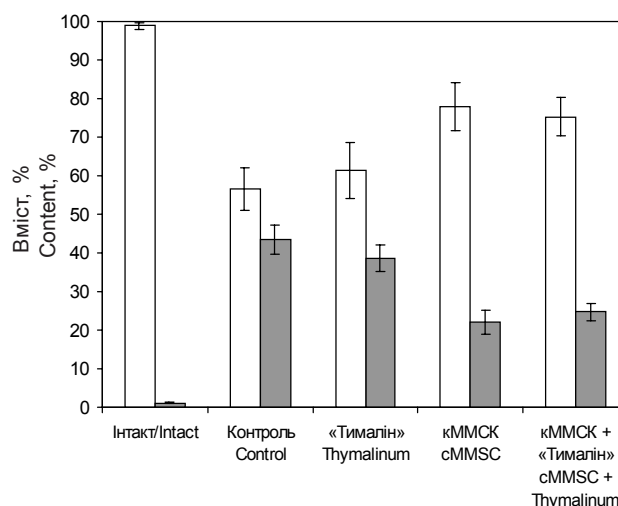


Рис. 1. Середня кількість ембріонів (□) та незапліднених яйцеклітин (■) у яйцеводах дослідних тварин під час запліднення за умов супер-овуляції після різних методів лікування хронічного запалення яєчників.

Fig. 1. Average number of embryos (□) and unfertilized oocytes (■) in oviducts of experimental animals following fertilization under superovulation conditions after different treatments of chronic inflammation of ovaries.

determined per one female, survival was calculated from 0 to 5th day of life (the ratio of mice survived up to the 5th day to those which were living at birth) and there was evaluated the dynamics of body weight during 15 days of life.

For statistical analysis of the results there was used a single-factor analysis of variance and t-Student test with the software Statistica 8 (Statsoft, USA). The critical level of significance equals to 0.05. Results are presented as the means and their errors ($M \pm m$).

Results and discussion

The first research stage was to comparatively estimate the number of embryos and unfertilized oocytes after a cycle of hormonal stimulation of the ovaries. Fertilization of intact females under superovulation conditions gave a relative number of fertilized eggs, developing up to the stage of two-cell embryos, equal to $(98.8 \pm 0.7)\%$ (Fig. 1). In the control group with a physiological saline administration this index did not exceed $(56.5 \pm 5.5)\%$. Animals treated with ‘Thymalinum’ showed a tendency of an increased number of fertilized eggs $(61.4 \pm 7.1)\%$ if compared with the control group, but this difference was statistically insignificant. The highest values were obtained in experimental groups with the introduced cMMSCs alone and in combination with ‘Thymalinum’ (relative number of fertilized eggs, developed up to the stage of two-cell embryos was significantly higher vs. the control and made $(77.9 \pm 6.3)\%$ and $(75.3 \pm 4.9)\%$, respectively). Based on the above, one can



інтактними тваринами. Проте внутрішньовенне введення кММСК окремо та у комбінації з «Тималіном» сприяло збільшенню цього показника порівняно з контролем (на 20 та 23% відповідно).

Середня кількість мишенят у потомстві інтактних тварин знаходилася у межах фізіологічних значень (рис. 3). У контрольній групі цей показник був у 2,2 рази нижче відносно інтакту. У групах із терапією кММСК окремо та у комбінації з «Тималіном» середня кількість мишенят у потомстві була вірогідно вищою, ніж у контролі (на 98 та 83% відповідно). Представлені результати в цілому узгоджуються з даними літератури, які вказують на позитивну кореляцію між показниками плідності та фізичного стану вагітних тварин [9].

Найвні осередки запалення в органах малого тазу безсумнівно впливають на внутрішньоутробний розвиток плода та перебіг постнатального періоду онтогенезу [11]. Саме тому необхідною стала оцінка рівня виживання та динаміки маси тіла мишенят, народжених від самок із хронічним запаленням яєчників після різних методів терапії.

Постнатальний розвиток потомства в усіх групах тварин характеризувався високою виживаністю. Так, у період від народження по 5-ту добу виживання потомства інтактних тварин складало $(97,4 \pm 1,2)\%$, контрольної групи – $(96,5 \pm 1,1)\%$, тварин із терапією «Тималіном» і кММСК окремо та у комбінації – $(97,3 \pm 1,5)$, $(95,9 \pm 0,9)$ і $(98,2 \pm 0,6)\%$ відповідно.

Динаміка маси тіла мишенят упродовж перших 15-ти діб дещо відрізнялася між групами (таблиця).

argue about lower ovarian response to hormonal stimulation in the animals with chronic inflammation. Cell therapy contributed to the restoration of ovarian reserve and increasing in the relative number of embryos under superovulation conditions.

A similar trend was observed in the series of experiments with insemination of females in natural estrous cycle. The incidence of pregnancy in intact animals was in average $(86.6 \pm 5.4)\%$ (Fig. 2), being within the normal range for mice of this age [2]. Under a chronic inflammation of the ovaries and introduction of either saline or ‘Thymalinum’ a pregnancy rate in natural estrous cycle decreased if compared to the intact animals. However, intravenous injection of cMMSCs *per se* and in combination with ‘Thymalinum’ contributed to an increase in this index if compared with the controls (20 and 23%, respectively).

The average number of pups in offspring of intact animals was within physiological values (Fig. 3). In the control group, this value was 2.2 times lower vs. the intact one. In the groups with cMMSCs therapy alone and in combination with ‘Thymalinum’ an average number of offspring of the mice was significantly higher than in the controls (98 and 83%, respectively). The results are generally consistent with the reported data, pointing to a positive correlation between fertility rates and physical condition of pregnant animals [15].

Existing inflammation foci in pelvic organs surely affect an intrauterine fetal development and the course of ontogenesis postnatal period [10]. Therefore an assessment of the survival rate and body weight

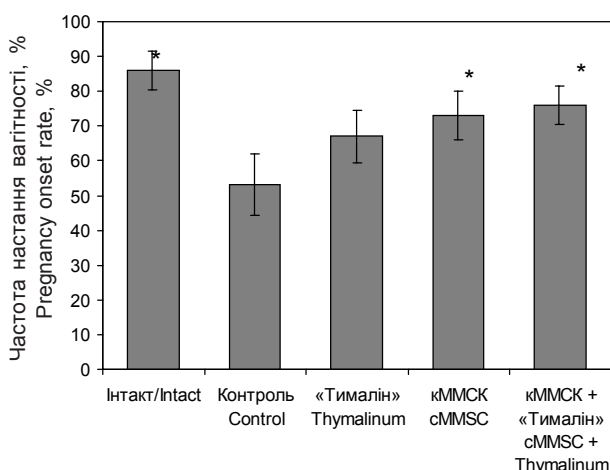


Рис. 2. Частота настання вагітності у мишей після різних методів терапії хронічного запалення яєчників; * – різниця статистично значуща з відповідним показником у групі контролю ($p < 0,05$).

Fig. 2. Pregnancy onset rate in mice after various therapies of chronic inflammation of ovaries; * – statistically significant difference with corresponding index in the control group ($p < 0.05$).

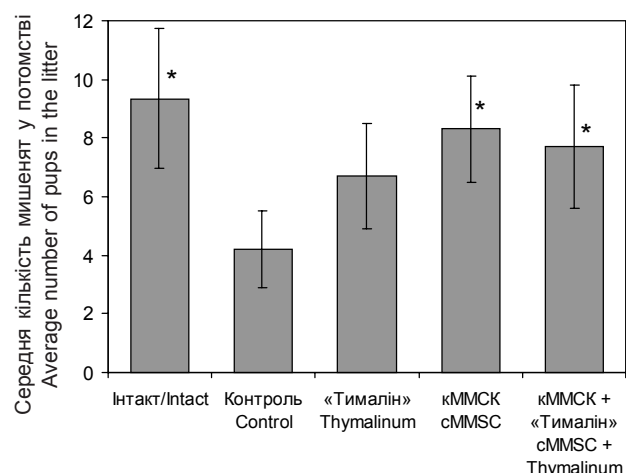


Рис. 3. Середня кількість мишенят у потомстві мишей після різних методів терапії хронічного запалення яєчників; * – різниця статистично значуща з відповідним показником у групі контролю ($p < 0,05$).

Fig. 3. Average number of pups in offspring of mice after various therapies of chronic inflammation of ovaries; * – statistically significant difference with corresponding index in the control group ($p < 0.05$).

Динаміка середньої маси тіла мишенят у потомстві мишей після різних методів терапії хронічного запалення яєчників
Dynamics of average body weight in mice offspring after various therapies of chronic inflammation of ovaries

Група тварин Group of animals	Строк спостереження, доба Observation term, days			
	1	5	10	15
Інтакт Intact	2,34 ± 0,57	3,21 ± 0,53	5,17 ± 1,37	6,63 ± 1,73
Контроль Control	1,25 ± 0,19	2,24 ± 0,90	4,28 ± 1,11	6,76 ± 1,40
«Тималін» 'Thymalinum'	1,79 ± 0,38	3,05 ± 0,55*	5,00 ± 1,33*	6,33 ± 1,49
кММСК сММСК	1,77 ± 0,28*	3,03 ± 0,49	4,86 ± 1,21*	6,53 ± 1,08
кММСК + «Тималін» сММСК + 'Thymalinum'	1,90 ± 0,33*	2,92 ± 0,68	5,33 ± 1,13*	6,89 ± 1,17

Примітка: * – різниця статистично значуща з відповідним показником у групі контролю ($p < 0,05$).

Note: * – statistically significant difference with corresponding index in the control group ($p < 0.05$).

Приріст маси тіла мишенят в інтактній групі впродовж усього терміну спостереження знаходився у межах фізіологічної норми для мишей даного віку [14]. Приріст маси тіла інтактних тварин і тварин із дослідних груп незначучо відрізнявся. У групі контролю з введенням фізіологічного розчину на ранніх строках спостерігався уповільнений набір маси тіла мишенят на відміну від решти тварин, проте на 15-ту добу ця різниця нівелювалася.

Таким чином, внутрішньовенне введення кММСК кісткового мозку позитивно впливає на фертильність, яка знижена на тлі хронічного запалення яєчників, а саме під час суперовуляції посилюється відповідь яєчників на гормональні стимули та збільшується відносна кількість запліднених яйцеклітин, частота настання вагітності та середня величина послідів у природному естральному циклі.

Оваріальний резерв, тобто здатність яєчників відповідати на гормональну стимуляцію зростанням повноцінних фолікулів, які містять здорові яйцеклітини, є базовим показником жіночої фертильності [10, 12]. У тварин із клітинною терапією під час стимуляції суперовуляції відбувалося дозрівання набагато більшої кількості фолікулів у порівнянні з контрольною групою. Під впливом клітинної терапії вдалося не тільки отримати ооцити потрібної якості, а й домогтися високої частоти настання вагітності.

Коригуючий вплив внутрішньовенного введення кММСК кісткового мозку на протікання запального

dynamics of pups born by the females with chronic inflammation of the ovaries after various therapies became necessary.

Postnatal development of offspring in all the groups of animals was characterized with a high survival. In particular, within the period from the birth to the 5th day of life the offspring survival in intact animals made (97.4 ± 1.2)%, for the control group it was (96.5 ± 1.1)%, for those having therapy with 'Thymalinum' and cMMSCs alone and in combination were (97.3 ± 1.5), ($95.9\% \pm 0.9$) and (98.2 ± 0.6)%, respectively.

Dynamics of body weight of pups during the first 15 days of life slightly differed in various groups (Table). An increase in a body weight in pups of the intact group throughout the observation period was within physiological norm for mice of this age [2]. An increase in body weight of intact animals and those from experimental groups differed insignificantly. In the control group with the introduced physiological saline at early

observation terms a slow rise of pups body weight was observed unlike other animals, but to day 15 the difference disappeared.

Thus, intravenous injection of cMMSCs of bone marrow positively affected the fertility, which was reduced on a background of chronic inflammation of the ovaries, *i. e.* an ovarian response to hormonal stimuli strengthened and the relative number of fertilized oocytes increased during superovulation, as well as the frequency of pregnancy onset and average number of litters in natural estrous cycle.

An ovarian reserve, *i. e.* the ability of ovaries to respond to hormonal stimulation by a growth of fully functional follicles, containing healthy oocytes is a basic measure of female fertility [9, 16]. In the animals underwent cell therapy the stimulation of superovulation resulted in the maturation of much more follicles as compared to the control group. Under the influence of cell therapy we succeeded to get not only the desired oocyte quality but also a high frequency of pregnancy incidence.

Corrective effect of intravenous injection of bone marrow cMMSCs on the course of inflammation in ovaries is likely associated with immune modulatory properties of MMSCs. As there was reported [7, 8, 19] activation of the MMSCs immunosuppressive function in the body follows the launch IFN- γ alone or together with TNF α , IL-1 α and IL-1 β . It has been shown [1] that among many growth factors, produced by bone marrow MMSCs, in particular VEGF, HGF



процесу в яєчниках ймовірно пов'язаний з імуномодулюючими властивостями ММСК. За даними деяких авторів [15, 16, 21] для активації імуносупресивної функції ММСК в організмі відбувається запуск механізмів дії IFN- γ окремо або разом із TNF- α , IL-1 α та IL-1 β . Було показано [13], що серед багатьох факторів росту, які продукують ММСК кісткового мозку, саме VEGF, HGF і IGF-1 сприяють відновленню функції та структури яєчників. Згідно з отриманими результатами можна вважати, що здатність ММСК до секреції цитокінів та ростових факторів обумовлює регенераторні зміни на тканинному та органному рівнях.

Завдяки процесу «хомінгу», існування якого доведено в багатьох експериментальних роботах, відбувається міграція клітин до ушкоджених тканин [18, 19], що забезпечує реалізацію ефектів клітинної терапії на рівні органів. Важливо, що методика внутрішньовенного введення – безпечна та неінвазивна, а отже, системне введення ММСК може бути одним із напрямків терапії хронічного запалення яєчників.

Висновки

Таким чином, внутрішньовенне введення кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку тваринам із хронічним запаленням яєчників сприяє збільшенню відповіді яєчників на гормональні стимули, відносної кількості запліднених яйцеклітин під час суперовуляції, а також частоти настання вагітності та середньої величини послідів у природному естральному циклі. На основі представлених результатів проведеного дослідження можна припустити можливість застосування кріоконсервованих ММСК у якості репаративного та імуномодулюючого матеріалу в галузі клітинної терапії гінекологічних захворювань.

Література

1. Биология развития млекопитающих. Методы/ Под ред. М. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
2. Волкова Н.О. Дослідження морфофункціональних характеристик кріоконсервованих культур клітин стромального походження // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №2. – С. 118–125.
3. Волкова Н.О., Юхта М.С., Юрчук Т.О. та ін. Показники крові тварин з хронічним запаленням яєчників та введенням мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 2, Т. 3 (120). – С. 109–112.
4. Грищенко Н.Г., Грищенко В.И., Смольянинова Е.И. и др. Влияние криоэкстракта плаценты на индукцию суперовуляции у лабораторных мышей с хроническим воспалением яичников // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 327–337.

and IGF-1 help restore the structure and function of the ovaries. Due to these findings we can assume that the ability of MMSCs to secrete the cytokines and growth factors causes the regenerative changes at tissue and organ levels.

Due to 'homing', the existence of which is proven in many experimental studies, there is a migration of cells to a damaged tissue [18, 19], providing the implementation of the effects of cell therapy at the level of organs. Importantly, that the method of intravenous injection is safe and non-invasive, and therefore a systemic administration of MMSCs can be one of the areas to treat chronic ovarian inflammation.

Conclusions

Thus, an intravenous injection of cryopreserved bone marrow mesenchymal stromal cells to the animals with chronic inflammation of ovaries contributes to increased ovarian response to hormonal stimuli, a relative number of fertilized eggs during superovulation and frequency of pregnancy onset rate as well as an average size of litters in natural estrous cycle. Based on the presented results of the conducted research the possibility of using the cryopreserved MMSCs as reparative and immune modulating material in cell therapy of gynecology diseases could be suggested.

References

1. Abd-Allah S.H., Shalaby S.M., Pasha H.F. et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 2013; 15: 64–75.
2. Bailey M.M., Boohaker J.G., Sawyer R.D. et al. Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 2006; 77(3): 244–249.
3. Drannik G.N. *Clinical Immunology and allergology*. Moscow: Med. Inform. Agentstvo; 2003.
4. Dubossarskaya Z.M., Mylyanovskyy A.I., Kolyadenko V.G. *Chronic inflammatory processes in women sexual organs*. Kiev: Zdorovyе; 2003.
5. Egorov N.S. *Practical microbiology*. Moscow: Moscow State University; 1976.
6. Grischenko N.G., Grischenko V.I., Smoljaninova E.I. et al. Effect of placental cryoextract on superovulation induction in mice with chronic ovary inflammation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2010; 20 (3): 327–337.
7. Frenette P.S., Pinho S., Lucas D., Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Ann Rev Immunol* 2013; 31: 285–316.
8. Fu X., He Y., Xie C. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008; 10: 353–363.
9. Hruleva N.V., Csherbajuk T.G., Potekhina Ju.P. Peculiarities of a female reproductive system response to the superovulation stimulation in the IVF cycle. *Sovremennye Tehnologii v Meditsine* 2011; 1: 20–23.



5. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М. : ООО «Мед. информ. агентство», 2003. – 604 с.
6. Дубоссарская З.М., Милянковский А.И., Коляденко В.Г. Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов. – К.: Здоровье, 2003. – 151 с.
7. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: МГУ, 1976. – 307 с.
8. 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.
9. Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Эволюционная экология плодовитости животных: адаптивные возможности потомков predeterminedются условиями их пренатального развития (на примере водяной полевки, *Arvicola terrestris* L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, №3. – С. 485–492.
10. Хрулева Н.В., Щербатюк Т.Г., Потехина Ю.П. Особенности реакции женской репродуктивной системы на стимуляцию суперовуляции в цикле ЭКО // Современные технологии в медицине. – 2011. – №1. – С. 20–23.
11. Хурасева А.Б. Роль наследственного фактора в формировании массы плода // Системный анализ и управление в биомед. системах. – 2008. – Т. 7, №2. – С. 375–378.
12. Щербина Н.А., Градиль О.Г. Оценка возрастных изменений овариального резерва у женщин с бесплодием // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, №2, Ч. 2. – С. 140–144.
13. Abd-Allah S.H., Shalaby S.M., Pasha H.F. et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 15. – P. 64–75.
14. Bailey M.M., Boohaker J.G., Sawyer R.D. et al. Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring // *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*. – 2006. – Vol. 77, №3. – P. 244–249.
15. Frenette P.S., Pinho S., Lucas D., Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine // *Ann. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 285–316.
16. Fu X., He Y., Xie C. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage // *Cytotherapy*. – 2008. – Vol. 10. – P. 353–363.
17. Komarova S., Roth J., Alvarez R. et al. Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor // *Journal of Ovarian Research*. – 2010. – Vol. 3, №12. – P. 12–18.
18. Liu J., Zhang H., Zhang Y. et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats // *Mol. Cells*. – 2014. – Vol. 37, №12. – P. 865–872.
19. Sohni A., Verfaillie C.M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking // *Stem Cells Int.* – 2013. – ID 130763.
20. Takehara Y., Yabuuchi A., Ezoe K. et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function // *Laboratory Investigation*. – 2013. – Vol. 93. – P. 181–193.
21. Vijayalakshmi V., Soundarya L. Promise(s) of using mesenchymal stem cells in reproductive disorders // *Indian J. Med. Res.* – 2014. – Vol. 140, №1. – P. 98–105.
22. Volkova N.A., Yukhta M.S., Yurchuk T.A. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of the murine ovaries // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Vol. 7, №5. – P. 35–42.
23. Weina L., Qixuan X., Junwen Q. et al. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on immunological injury of the ovary in mice // *J. South Med. Univ.* – 2011. – Vol. 31, №5. – P. 825–829.
10. Huraseva A.B. The role of hereditary factors in the formation of fetal weight. *System Analysis and Management in Biomedical Systems* 2008; 7(2): 375–378.
11. Komarova S., Roth J., Alvarez R. et al. Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor. *Journal of Ovarian Research* 2010; 3(12): 12–18.
12. Liu J., Zhang H., Zhang Y. et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells* 2014; 37(12): 865–872.
13. Mank M., editor. *Developmental biology of mammals*. Methods. Moscow; 1990.
14. Medical and demographic situation and organization of medical care in 2010: results of the health system and implementation of the Program of Economic Reforms in 2010–2014 "Prosperous Society, Competitive Economy, Effective State". Kiev: Ministry of Health of Ukraine; 2011.
15. Nazarova G.G., Evsikov V.I. Evolutionary ecology of animal fertility: the fitness of the progeny is determined by their prenatal development (by the example of the european water vole, *Arvicola Terrestris* L.). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2011; 15 (3): 485–492.
16. Scherbina N.A., Gradil O.G. Assessment of age changes of ovarian reserve in infertile women. *Tavricheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik* 2013; 16 (2): 140–144.
17. Sohni A., Verfaillie C.M. Mesenchymal stem cells migration, homing and tracking. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 130763.
18. Takehara Y., Yabuuchi A., Ezoe K. et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Laboratory Investigation* 2013; 93: 181–193.
19. Vijayalakshmi V., Soundarya L. Promise(s) of using mesenchymal stem cells in reproductive disorders. *Indian J Med Res* 2014; 140 (1): 98–105.
20. Volkova N.O. Study of morphological characteristics of cryopreserved cell cultures of stromal origin. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2012; 22 (2): 118–125.
21. Volkova N.O., Yukhta M.S., Yurchuk T.O. et al. Haematological parameters of animals with chronic inflammation of the ovaries and bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells administration. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny* 2015; 2(120): 109–112.
22. Volkova N.A., Yukhta M.S., Yurchuk T.A. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of the murine ovaries. *Biotechnologia Acta* 2014; 7(5): 35–42.
23. Weina L., Qixuan X., Junwen Q. et al. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on immunological injury of the ovary in mice. *J South Med Univ* 2011; 31(5): 825–829.

