

Экспрессия факторов паракринной регуляции в яичниках крыс при коррекции экспериментальных функциональных кист яичников

Волченко Д.А., Тихоновская О.А., Мустафина Л.Р., Логвинов С.В.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск)

Expression of paracrine regulation factors in rat's ovaries when correcting experimental functional ovarian cysts

Volchenok D.A., Tikhonovskaya O.A., Mustafina L.R., Logvinov S.V.

Siberian State Medical University (Tomsk)

АННОТАЦИЯ

С целью изучения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), костного морфогенетического протеина – 15 (BMP-15) и коннексина – 37 (Cx-37) в яичниках крыс с моделью функциональных кист яичников и при их коррекции был проведен эксперимент на половозрелых белых крысах-самках линии Wistar. Группа I (основная, $n = 25$) — моделирование функциональных кист яичников (введение фолликулостимулирующего гормона) с последующим лечением бевацизумабом. Группа II (сравнения, $n = 35$) — моделирование функциональных кист яичников без последующего лечения. Группа контроля ($n = 20$) — интактные животные. Крысы выводились из эксперимента на 7, 15, 30-е сутки. Проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии VEGF, BMP-15, Cx-37.

Моделирование функциональных кист яичников у белых крыс сопровождалось увеличением удельного объема сосудов в яичниках, усилением экспрессии VEGF в стенке кисты, избыточной стимуляцией фолликулогенеза, сопровождавшейся усилением экспрессии BMP-15 и Cx-37 на ранних сроках эксперимента. Введение ингибитора сосудисто-эндотелиального фактора роста вызывало уменьшение количества и удельного объема кист, снижение экспрессии VEGF и приближение удельного объема сосудов и экспрессии VEGF к значениям контрольной группы на 15-е сутки. К 30-м суткам экспрессия BMP-15 и Cx-37 не отличалась от показателей группы интактного контроля.

Таким образом, введение бевацизумаба ускоряет регресс функциональных кист яичников за счет снижения васкуляризации в стенке кисты, сопровождающейся снижением экспрессии VEGF. Выявленное уменьшение количества растущих фолликулов, усиление процессов атрезии в фолликулах и изменение экспрессии факторов овосоматического взаимодействия (BMP-15, Cx-37) имеют кратковременный характер.

Ключевые слова: бевацизумаб, лечение функциональных кист яичников, сосудисто-эндотелиальный фактор роста, костный морфогенетический протеин – 15 (BMP-15), коннексин – 37 (Cx-37).

ABSTRACT

To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenetic protein – 15 (BMP-15) and connexin 37 (Cx-37) in the rat's ovaries with the model of functional ovarian cysts and with their correction, an experiment was conducted on mature white rats of Wistar line. Group I (main, $n = 25$) — modelling of functional ovarian cysts (introduction of follicle-stimulating hormone) followed by treatment with bevacizumab. Group II (comparison, $n = 35$) — modelling of functional ovarian cysts without further treatment. The control group ($n = 20$) is intact animals. Rats were removed from the experiment on the 7th, 15th, 30th day. An immunohistochemical study of the expression of VEGF, BMP-15, Cx-37 has been conducted.

Modelling of functional ovarian cysts in white rats was accompanied by an increase in the specific volume of blood vessels in the ovaries, increased expression of VEGF in the cyst wall, excessive stimulation of folliculogenesis, accompanied by increased expression of BMP-15 and Cx-37 at the early stages of the experiment. Introduction of an inhibitor of vascular endothelial growth factor caused a decrease in the number and specific volume of cysts, a decrease in VEGF expression and the approximation of specific vascular volume and VEGF expression to the values of the control group on the 15th day. By day 30, expression of BMP-5 and Cx-37 did not differ from that of the intact control group.

Поступила 13.12.2018
Принята 25.12.2018

* Автор, ответственный за переписку
Волченко Дарья Александровна: ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
E-mail: daria.trus.2017@gmail.com

Received 13.12.2018
Accepted 25.12.2018

*Corresponding author
Volchenok Daria Aleksandrovna: Siberian State Medical University, 2, Moskovsky Trakt, Tomsk, 634050, Russia.
E-mail: daria.trus.2017@gmail.com

Thus, the introduction of bevacizumab accelerates the regression of functional ovarian cysts by reducing vascularization in the cyst wall, accompanied by a decrease in the expression of VEGF. The revealed decrease in the number of growing follicles, the enhancement of atresia processes in the follicles and the change in the expression of factors of oocyte-somatic interaction (BMP-15, Cx-37) are of short duration.

Keywords: bevacizumab, treatment of functional ovarian cysts, vascular endothelial growth factor, bone morphogenetic protein – 15 (BMP-15), connexin 37 (Cx-37).

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых методов лечения функциональных кист яичников в настоящее время является весьма актуальным [1, 2]. Существующие методы лечения, как медикаментозные, так и хирургические, часто оказываются неэффективными, сопровождаются высоким риском рецидивирования. Оперативные вмешательства на яичниках даже с соблюдением принципа функциональной хирургии являются фактором, снижающим овариальный резерв и фертильность [1–3].

Исследования последних лет продемонстрировали, что локальные внутрифолликулярные регуляторные механизмы играют ключевую роль в физиологическом течении фолликулогенеза, так как опосредуют и модулируют действие центральных и многих других механизмов регуляции [4–7]. Изучение факторов паракринной регуляции взаимодействий между ооцитом и окружающими его клетками гранулезы позволит исследовать не только патогенез функциональных кист яичников, но и механизмы формирования сопутствующей овариальной недостаточности. Основными и наиболее изученными факторами взаимодействия в системе ово-соматического гистона являются костный морфогенетический протеин – 15 (BMP-15) [8–10] и коннексин – 37 (Cx-37) [11].

В последние годы активно изучается роль сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в патогенезе функциональных кист. Доказано, что VEGF формирует стабильный кровоток в сосудах яичника, повышает проницаемость стенки микрососудов антрального фолликула, что приводит к аккумуляции фолликулярной жидкости, ингибирует апоптоз [12–15]. Экспериментально выявлено, что введение ингибитора VEGF в начале фолликулярной фазы подавляет васкуляризацию текальных клеток и рост фолликулов [12, 13].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, костного морфогенетического протеина – 15 и коннексина – 37 в яичниках крыс с моделью функциональных кист яичников при их коррекции.

INTRODUCTION

The search for new methods of treating functional ovarian cysts is currently highly relevant [1, 2]. Existing treatment methods, both medical and surgical, are often ineffective, accompanied by a high risk of recurrence. Surgical treatment, even with the principle of functional surgery, is a factor that reduces the ovarian reserve and fertility [1–3].

Recent studies have demonstrated that local intrafollicular regulatory mechanisms play a key role in the physiological course of folliculogenesis, as they mediate and modulate the action of central and many other regulatory mechanisms [4–7]. The study of the factors of paracrine regulation of interactions between the oocyte and the granulosa surrounding it will allow investigating not only the pathogenesis of functional ovarian cysts but also the mechanisms of the formation of concomitant ovarian failure. Bone morphogenetic protein – 15 (BMP-15) [8–10] and connexin 37 (Cx-37) [11] are the main and most studied interaction factors in the oocyte-somatic histion system.

In recent years, the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of functional cysts has been actively studied. It has been proven that VEGF forms a stable blood flow in the vessels of the ovary, increases the permeability of the wall of the microvessels of the antral follicle, which leads to the accumulation of follicular fluid, inhibits apoptosis [12–15]. It was experimentally found that the introduction of a VEGF inhibitor at the beginning of the follicular phase suppresses the vascularization of the theca cells and the growth of the follicles [12, 13].

AIM OF THE RESEARCH

To study the expression of vascular endothelial growth factor, those of bone morphogenetic protein – 15 and connexin 37 in rat's ovaries with a model of functional ovarian cysts and in their correction.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals were mature female Wistar rats weighting 180–220 g. Group I (main,

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные — половозрелые самки крыс линии Wistar массой 180–220 г. Группа I (основная, $n = 25$) — животные с моделью функциональных кист яичников и введением бевацизумаба; группа II (сравнения, $n = 35$) — животные с моделью функциональных кист яичников без последующего лечения; группа III (контроль, $n = 20$) — интактные животные. Для формирования экспериментальных функциональных кист яичников экспериментальным животным вводился рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон (рФСГ) в дозе 1.5 МЕ (производитель — «Индустрия Фармасыютика Сероно С.п.А.», Италия) в течение 7 дней в первой половине дня внутримышечно в ягодичную область. Аналогичным образом вводили 6 мг бевацизумаба — ингибитор VEGF (производитель — «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария) дважды на 8-е и 22-е сутки эксперимента. Бевацизумаб — гуманизированные рекомбинантные гиперхимерные моноклональные антитела, которые селективно связываются с биологически активным VEGF и нейтрализуют его, ингибируя связывание фактора роста эндотелия сосудов с его рецепторами 1-го и 2-го типа (Flt-1, KDR) на поверхности эндотелиальных клеток.

Эксперимент проведен в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (ETS № 123)» (Страсбург, Франция, 1986), принципами Хельсинкской декларации (9-й пересмотр, Форталеа, Бразилия, 2013). Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск (протокол № 4356 от 30.11.2015).

Яичники экспериментальных животных фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин. Иммуногистохимическая методика исследования экспрессии BMP-15, Cx-37, VEGF включала в себя использование стрептавидин-биотиновой системы детекции Abcam®PLC (Великобритания) Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit для высокотемпературной демаскировки антигена. Результат определяли по коричневому окрашиванию цитоплазмы и мембраны. Полуколичественную оценку проводили по формуле H-score согласно R.A. McClelland et al. (1991): $(1 \times \text{процент слабо позитивных клеток}) + (2 \times \text{процент умеренно позитивных клеток}) + (3 \times \text{процент сильно позитивных клеток})$.

Для статистической обработки и анализа результатов использовали программу IBM SPSS

$n = 25$) consisted of animals with a model of functional ovarian cysts and introduction of bevacizumab; group II (comparison group, $n = 35$) included animals with a model of functional ovarian cysts without further treatment; group III (control group, $n = 20$) included intact animals. For the formation of experimental functional ovarian cysts, experimental animals were injected with recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) at a dose of 1.5 IU (manufactured by Industry Pharmaceutical Serono S.P.A., Italy) for 7 days in the first half of the day intramuscularly into the buttock region. Similarly, 6 mg of bevacizumab were injected as a VEGF inhibitor (manufacturer: F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) twice on the 8th and 22nd day of the experiment. Bevacizumab is humanized recombinant hyperchimeric monoclonal antibodies that selectively bind to biologically active VEGF and neutralize it by inhibiting the binding of vascular endothelial growth factor to its type 1 and 2 receptors (Flt-1, KDR) on the surface of endothelial cells.

The experiment was conducted in accordance with the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 123)” (Strasbourg, France, 1986), principles of the Helsinki Declaration (9th revision, Fortaleza, Brazil, 2013). The study was approved by the Ethical Committee of the Siberian State Medical University, Tomsk (Protocol No. 4356 of 11/30/2015).

Ovaries of experimental animals were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin. An immunohistochemical method for studying the expression of BMP-15, Cx-37, VEGF involved the use of the Abcam®PLC (the UK) Streptavidin-Biotin Detection System Rabbit Specific HRP / DAB (ABC) Detection IHC kit for high-temperature unmasking of antigen. The result was determined by brown staining of the cytoplasm and membrane. A semi-quantitative assessment was performed using the H-score formula according to R.A. McClelland et al. (1991): $(1 \times \text{percentage of weakly positive cells}) + (2 \times \text{percentage of moderately positive cells}) + (3 \times \text{percentage of highly positive cells})$.

For statistical processing and analysis of the results, IBM SPSS Statistics v.23.0.5 was used. Data distribution forms were checked, an exploratory analysis was used (Shapiro – Wilk criterion), Mann – Whitney U-test was used to study the compared groups (critical significance level $p = 0.05$).

Statistics v.23.0.5. Проводили проверки формы распределения данных, использовали разведочный анализ (критерий Шапиро — Уилка), для исследования сравниваемых групп применяли U-критерий Манна — Уитни (критический уровень значимости $p = 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С применением методики иммуногистохимического анализа в яичниках дифференцированы маркеры взаимодействия ооцита и клеток гранулезы (BMP-15, Cx-37), а также фактор ангиогенеза VEGF. Экспрессия изучаемых факторов при моделировании ФКЯ была типичной, однако применение полуколичественной методики H-score позволило оценить степень экспрессии и её изменения у животных сравниваемых групп.

Экспрессия BMP-15 была выявлена в виде цитоплазматического окрашивания овоцитов и клеток кумулюса, эндокриноцитов теки, стромы коры яичника, лютеоцитов желтого тела и клеток поверхностного эпителия. В овоцитах примордиальных и первичных фолликулов (ПФ и ПРФ), а также в овоцитах растущих фолликулов с начальными признаками атрезии, в которых половая клетка была сохранна, интенсивность экспрессии была наиболее выраженной, в овоцитах вторичных и третичных фолликулов (ВРФ и ТРФ) — наименее выраженной. Фолликулярный эпителий окрашивался менее интенсивно, экспрессия усиливалась соответственно стадии развития фолликулов. На 7-е сутки введения ФСГ увеличивалась интенсивность иммуноокраски овоцитов всех типов фолликулов (рис. 1, А, В). Интенсивность окраски эпителиоцитов яйцекносного бугорка и париетальных эпителиоцитов гранулёзы в экспериментальной группе незначительно повышалась только в ранние сроки опыта (7-е сутки) в ПФ и фолликулах, только вступивших в рост; в ВРФ и ТРФ изменений не обнаруживалось. К 15-м суткам опыта экспрессия BMP-15 снижалась во всех типах фолликулов, а к 30-м соответствовала таковой в группе контроля.

В основной группе на 15-е сутки эксперимента экспрессия BMP-15 в ооцитах всех типов растущих фолликулов снижалась, не демонстрируя отличий от группы контроля. К 30-м суткам усиление экспрессии сохранялось только в ПФ и ПРФ, в то время как значения ВРФ и ТРФ соответствовали таковым в группе контроля (табл. 1).

Экспрессия Cx-37 была выявлена в ооцитах, *zona pellucida*, висцеральных фолликулоцитах, клетках кумулюса, отдельных лютеоцитах и эндо-

RESULTS AND DISCUSSION

Using the method of immunohistochemical analysis in the ovaries, markers of interaction between the oocyte and granulosa cells (BMP-15, Cx-37), as well as the VEGF angiogenesis factor, were differentiated. When modeling ovarian follicular cyst (OFC), the expression of the studied factors was typical but the use of the semi-quantitative H-score technique allowed us to estimate the degree of expression and its changes in animals of the compared groups.

BMP-15 expression was detected in the form of cytoplasmic staining of oocytes and cumulus cells, endocrine cells of the theca, the stroma of ovarian cortex, corpus luteum cells, and epithelial cells. In oocytes of primordial and primary follicles (PF and PmF), as well as in oocytes of growing follicles with initial signs of atresia, in which the germ cell was preserved, expression was most pronounced, in oocytes of secondary and tertiary follicles (SF and TF) — less pronounced. The follicular epithelium was stained less intensively; the expression was enhanced according to the stage of follicular development. On the 7th day of FSH introduction, the immunostaining of oocytes of all types of follicles increased (Fig. 1, A, B). The colour intensity of epithelial cells of the cumulus oophorus and parietal epithelial cells of the granulosa in the experimental group increased slightly only in the early stages of the experiment (7th day) in the PF and follicles that just began to grow; no changes were observed in the SF and TF. By the 15th day, BMP-15 expression was reduced in all types of follicles, and by the 30th day, it was the same in the control group.

In the main group, on the 15th day of the experiment, BMP-15 expression in oocytes of all types of growing follicles decreased, not showing differences from the control group. By the 30th day, expression enhancement was maintained only in PF and PmF, while the values of SF and TF corresponded to those in the control group (Table 1).

Cx-37 expression was detected in oocytes, *zona pellucida*, visceral follicular cells, cumulus cells, certain luteal cells, and vascular endothelial cells. Oocytes were stained more intensively than follicular epithelium cells. Weak and moderate immunopositive staining was observed on the surface of oocytes (membrane) of PF the border with granulosa cells. The immunopositive reaction increased in a wave-like manner according to the growth and development stage of the follicles, reaching a maximum at the end of the pre-antral stage (Fig. 1, C); similar dy-

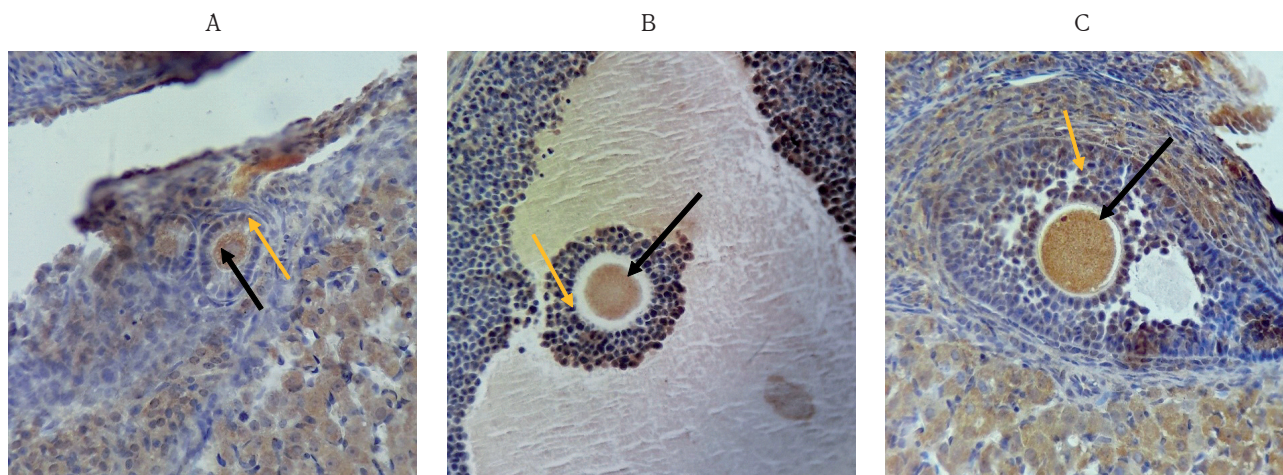


Рис. 1. Экспрессия BMP-15 и Cx-37 на 7-е сутки эксперимента. Черная стрелка указывает на овоцит, желтая — на фолликулоцит. Окраска DAB, докраска гематоксилином. Увеличение 400:

А — экспрессия BMP-15 в первичном фолликуле на 7-е сутки моделирования ФКЯ; В — экспрессия BMP-15 в третичном фолликуле на 7-е сутки моделирования ФКЯ; С — экспрессия Cx-37 во вторичном фолликуле на 7-е сутки моделирования ФКЯ

Fig. 1. Expression of BMP-15 and Cx-37 on the 7th day of the experiment. The black arrow indicates oocyte, the yellow one indicates follicular cell. DAB colouring, additional colouring by hematoxylin. Magnification 400:

А — BMP-15 expression in the PF on the 7th day of the OFC simulation; В — BMP-15 expression in the TF on the 7th day of the OFC simulation; С — Cx-37 expression in the SF on the 7th day of the OFC simulation

телиоцитах сосудов яичников крыс. Ооциты окрашивались более интенсивно, чем клетки фолликулярного эпителия. Слабое и умеренное иммунопозитивное окрашивание наблюдалось на поверхности ооцитов (мембранное) ПФ и границе с клетками гранулёзы. Иммунопозитивная реакция волнообразно нарастала соответственно стадии роста и развития фолликулов, достигала максимума в конце преантральной стадии (рис. 1, С); аналогичная динамика иммунной окраски отмечалась в фолликулярном эпителии. Фолликулы антральной и преовуляторной стадии (ВРФ и ТРФ) окрашивались диффузно, что связано с неравномерной иммулокализацией маркера в фолликулоцитах, слабой окраской ооцитов. При наличии признаков атрезии слабое и умеренное иммунное окрашивание определялось в клетках гранулёзы. Экспрессия Cx-37 оказывалась выраженной в АФ с гипертрофией теки, на начальных этапах атрезии в ооцитах при его сохранности.

При моделировании ФКЯ с помощью введения ФСГ отмечалась волнообразная динамика окрашивания ооцитов, аналогичная группе контроля, более выраженная в ооцитах ВРФ и ТРФ на 7-е сутки эксперимента. Фолликулярный эпителий ПРФ окрашивался слабее контроля. С 15-х до 30-х суток опыта экспрессия белка целевого взаимодействия в ооцитах не отличалась от таковой в группе контроля, однако снижение иммунной окраски в фолликулоцитах отмечалось до 30-х суток эксперимента.

namics of immune staining was observed in the follicular epithelium. The follicles of the antral and preovulatory stages (SF and TF) were stained diffusely, which is due to the uneven immunolocalization of the marker in the follicular cells and weak oocyte staining. In the presence of signs of atresia, weak and moderate immune staining was determined in granulosa cells. The expression of Cx-37 was expressed in atretic follicles with theca hypertrophy, at the initial stages of atresia in oocytes with its safety.

When simulating OFC with the introduction of FSH, wavy dynamics of oocyte staining was observed, similar to the control group, more pronounced in the oocytes of the SF and TF on the 7th day of the experiment. The follicular epithelium of the PmF was stained weaker than in the control group. From the 15th to the 30th day of the experiment, the expression of the gap junction protein in the oocytes did not differ from that in the control group but the decrease in the immune staining in the follicular cells had been observed until the 30th day of the experiment.

In the ovaries of animals of the main group, the expression of the marker did not differ from that in the control group. By the 15th day of the experiment, the intensity of immunostaining in oocytes had increased, demonstrating significant differences from the comparison group. Increased marker expression was observed in follicular cells, the effect was also observed on the 30th day of the experiment.

Таблица 1. Экспрессия VEGF, BMP-15, Cx-37, Me (Q_{25} – Q_{75})**Table 1.** Expression of VEGF, BMP-15, Cx-37, Me (Q_{25} – Q_{75})

Клетки, группа / Cells, group		7-е сутки / 7 th day	15-е сутки / 15 th day	30-е сутки / 30 th day
<i>VEGF</i>				
Эндотелиоциты Endothelial	Основная Main group	—	88.20 (69.40–94.70)*	73.30 (50.70–116.20)*
	Сравнения Comparison	149.17 (129.67–157.18)*	138.72 (116.73–140.90)*	116.88 (68.04–124.80)
	Контроль Control	62.34 (0–92.11)	79.12 (15.70–134.90)	92.31 (83.40–125.98)
Фолликулоциты Follicular	Основная Main group	—	94.30 (67.92–121.80)*	124.10 (116.34–182.20)*
	Сравнения Comparison	154.70 (144.82–178.22)*	137.80 (86.60–152.30)	117.22 (100.60–125.38)
	Контроль Control	84.90 (115.25–148.30)	111.50 (48.25–137.70)	113.80 (93.25–118.90)
<i>BMP-15</i>				
Ооцит Oocyte	Основная Main group	—	150.40 (120.40–180.00)	160.00 (50.00–220.00)
	Сравнения Comparison	230.00 (136.00–250.70)*	190.00 (170.00–220.50)*	175.00 (690.00–210.30)
	Контроль Control	120.60 (0–132.11)	160.82 (20.00–180.30)	150.40 (110.00–175.00)
Фолликулоциты Follicular	Основная Main group	—	150.40 (120.00–180.00)*	146.00 (112.00–185.50)*
	Сравнения Comparison	162.00 (130.00–192.00)*	200.00 (160.00–252.30)	75.60 (28.00–138.00)
	Контроль Control	110.00 (46.00–156.00)*	160.00 (122.50–233.00)	100.00 (34.80–142.10)
<i>Cx-37</i>				
Ооцит Oocyte	Основная Main group	—	250.00 (200.00–274.00)	190.00 (15.00–230.00)
	Сравнения Comparison	250.00 (29.67–57.18)*	270.00 (16.73–40.90)*	200.00 (8.04–24.80)
	Контроль Control	210.00 (0–32.11)	225.00 (5.70–34.90)	225.00 (3.40–25.98)
Фолликулоциты Follicular	Основная Main group	—	130.00 (54.00–157.80)	120.00 (36.80–175.00)
	Сравнения Comparison	100.00 (44.82–78.22)*	100.00 (26.60–52.30)	90.00 (2.60–25.38)
	Контроль Control	110.00 (15.25–48.30)	120.00 (12.25–37.70)	140.00 (3.25–18.90)

Примечания: Me — медиана; Q_{25} и Q_{75} — 25-й и 75-й процентиля соответственно; *значимые отличия от группы контроля, выявленные с помощью теста Манна — Уитни ($p < 0.05$); *значимые отличия от группы сравнения, выявленные с помощью теста Манна — Уитни ($p < 0.05$).

Notes: Me is the median; Q_{25} and Q_{75} are the 25th and 75th percentiles respectively; *significant differences from the control group identified using the Mann — Whitney test ($p < 0.05$); * significant differences from the comparison group identified using the Mann — Whitney test ($p < 0.05$).

В яичниках животных основной группы экспрессия маркера не отличалась от таковой в контрольной группе. К 15-м суткам эксперимента интенсивность иммуноокраски в ооцитах усилива-

VEGF expression was manifested as brown membrane and cytoplasm staining of follicular cells and endothelial cells. A high frequency of positive VEGF expression in endocrine cells of functional cysts of the

лась, демонстрируя значимые отличия от группы сравнения. В фолликулоцитах наблюдалось усиление экспрессии маркера, эффект прослеживался также на 30-е сутки эксперимента.

Экспрессия VEGF проявлялась в виде коричневого окрашивания мембраны и цитоплазмы фолликулоцитов и клеток эндотелия. Выявлена высокая частота положительной экспрессии VEGF в эндокриноцитах функциональных кист яичника. Иммунопозитивное окрашивание слабой и умеренной интенсивности наблюдалось на поверхности ооцитов (мембранное) и лютеоцитах желтого тела. На 7-е сутки моделирования ФКЯ экспрессия фактора была максимально выраженной в фолликулоцитах растущих фолликулов, с 15-х суток экспрессия VEGF не отличалась от контроля (см. табл. 1). Экспрессия маркера в эндотелиоцитах на 30-е сутки не отличалась от группы контроля.

При введении ФСГ формируются множественные фолликулярные кисты, стенка которых на раннем этапе развития состоит из 5–10 слоев гранулезных клеток, и кисты желтых тел, стенка которых представлена лютеоцитами. В дальнейшем прогрессируют явления дегенерации, стенка кисты истончается и формируется ретенционное образование, заполненное прозрачным секретом, а внутренняя выстилка капсулы представлена одним слоем плоских клеток и соединительной тканью.

Введение бевацизумаба животным с экспериментальными функциональными кистами вызывало уменьшение количества и удельного объема кист. Уже на 15-е сутки эксперимента при аутопсии обнаруживались уменьшение размеров яичников, исчезновение характерной бугристости, белесоватый оттенок поверхности. Иногда отмечалось локальное истончение белочной оболочки. Количество и удельный объем кист в яичниках крыс основной группы во все сроки эксперимента было меньше, чем в группе сравнения. На 60-е сутки эксперимента кистозные полости в яичниках не обнаруживались. Количество и удельный объем растущих и атретических фолликулов, а также желтых тел не отличались от группы сравнения на аналогичные сутки эксперимента, а к 60-м суткам были сопоставимы с интактными животными. Введение бевацизумаба вызывало снижение васкуляризации теки фолликулов и желтых тел и приближение удельного объема сосудов к значениям контрольной группы на 15-е сутки.

Исследование впервые установило изменение факторов паракринной регуляции овосоматического взаимодействия и ангиогенеза

ovary was detected. Immunopositive staining of weak and moderate intensity was observed on the surface of oocytes (membrane) and corpus luteum cells. On the 7th day of the OFC modelling, expression of the factor was most pronounced in the follicular cells of the growing follicles; from the 15th day, VEGF expression did not differ from that of the control group (see Table 1). Expression of the marker in endothelial cells on the 30th day did not differ from that in the control group.

With the introduction of FSH, multiple follicular cysts form, the wall of which at an early stage of development consists of 5–10 layers of granular cells, and cysts of the corpus luteum, the wall of which is represented by luteal cells. Subsequently, degeneration progresses, the cyst wall becomes thinner and a retention formation is formed, filled with a transparent secret, and the inner lining of the capsule is represented by one layer of flat cells and connective tissue.

Introduction of bevacizumab to animals with experimental functional cysts caused a decrease in the number and specific volume of cysts. Already on the 15th day of the experiment, at autopsy, a decrease in the size of the ovaries, the disappearance of the characteristic tuberosity, a whitish hue of the surface were found. Sometimes local thinning of the albumin was noted. The number and specific volume of cysts in the rats' ovaries of the main group during all periods of the experiment were less than in the comparison group. On the 60th day of the experiment, cystic cavities in the ovaries were not detected. The number and specific volume of growing and atretic follicles, as well as yellow bodies, did not differ from those in the comparison group on the same experimental day, and by the 60th day were comparable with intact animals. The introduction of bevacizumab caused a decrease in the vascularization of the theca of the follicles and yellow bodies and the approach of the specific volume of the vessels to the values of the control group on the 15th day.

The study for the first time established a change in the factors of paracrine regulation of oocyte-somatic interaction and angiogenesis during the formation of experimental functional ovarian cysts. When simulating OFC on the 7th day of rFSH introduction, an increase in BMP-15 expression in oocytes was detected in all types of growing follicles and Cx-37 in antral follicles was revealed. By the 15th day of the experiment, the expression of BMP-15 has been most pronounced in the oocytes of growing follicles, appears in primordial follicles, decreases in follicles with signs of atresia, in which the sex

при формировании экспериментальных функциональных кист яичников. При моделировании ФКЯ на 7-е сутки введения рФСГ выявлено повышение экспрессии BMP-15 в ооцитах во всех типах растущих фолликулов и Cx-37 в антральных фолликулах. К 15-м суткам опыта экспрессия BMP-15 наиболее выражена в ооцитах растущих фолликулов, появляется в примордиальных фолликулах, снижается в фолликулах с признаками атрезии, в которых половая клетка была сохранна. В фолликулоцитах первичных фолликулов наблюдаются снижение Cx-37, усиление экспрессии BMP-15. Фолликулярные эпителиоциты практически всех типов фолликулов демонстрируют снижение иммунной окраски BMP-15. На 30-е сутки эксперимента высокая экспрессия BMP-15 сохраняется в ооцитах первичных фолликулов.

BMP-15 играет важную роль в фолликулогенезе, в росте и дифференцировке клеток гранулезы, а также в формировании клеток теки с гонадотропин-независимой стадии фолликулогенеза [8]. Подтверждением является максимальная экспрессия данного фактора в преантральных фолликулах в проведенном исследовании, что согласуется с данными литературы [8]. BMP-15 синтезируется овоцитом. Генеральная концепция последних лет заключается в том, что в регуляции преантральных стадий фолликулогенеза, включая многослойные фолликулы, главную роль играет сам овоцит. Овоцит человека экспрессирует большие количества регуляторных белков GDF-9 и BMP-15, которые способны стимулировать рост многослойных фолликулов *in vitro* и осуществлять защиту клеток фолликула от апоптоза. Считается, что указанные вещества, синтезируемые овоцитом, стимулируют митозы фолликулярных эпителиоцитов и пространственное оформление слоев фолликулярного эпителия в первичных многослойных фолликулах, при этом существует определенная динамика их синтеза в течение половых циклов. Выявленное в проведенном исследовании повышение экспрессии фактора в ооцитах растущих фолликулов после введения рФСГ в ранние сроки может носить компенсаторный характер. Усиление экспрессии BMP-15 предотвращает апоптоз клеток гранулёзы, что проявляется активацией фолликулярного роста, увеличением растущих фолликулов.

Важным событием в развитии первичных фолликулов, способствующим активации пролиферации и гипертрофии эпителиальных клеток, является начало экспрессии белков группы коннексинов и образование межклеточных щелевых контактов (GJ) между овоцитом и клетками фол-

cell was preserved. In the follicular cells of the primary follicles, the study revealed a decrease in Cx-37 and an increase in the expression of BMP-15. Follicular epithelial cells of almost all types of follicles show a decrease in BMP-15 immune staining. On the 30th day of the experiment, the high expression of BMP-15 is retained in the oocytes of the primary follicles.

BMP-15 plays an important role in folliculogenesis, in the growth and differentiation of granulosa cells, as well as in the formation of theca cells from the gonadotropin-independent stage of folliculogenesis [8]. This fact is confirmed by the maximum expression of this factor in the preantral follicles in our study, which is consistent with the other research data [8]. BMP-15 is synthesized by the oocyte. The general concept of recent years is that the regulation of the preantral stages of folliculogenesis, including multi-layered follicles, is played by the oocyte itself. Human oocyte expresses large amounts of GDF-9 and BMP-15 regulatory proteins, which are able to stimulate the growth of multilayer follicles *in vitro* and protect follicle cells from apoptosis. It is believed that these substances synthesized by the oocyte stimulate the mitoses of follicular epithelial cells and the spatial design of the layers of the follicular epithelium in the primary multilayer follicles, while there is a definite dynamics of their synthesis during sexual cycles. The increase in the expression of the factor in the oocytes of growing follicles after introduction of rFSH at the early stages can be compensatory. Enhancing BMP-15 expression prevents apoptosis of granulosa cells, which is manifested by the activation of follicular growth and by an increase in growing follicles.

An important event in the development of primary follicles, promoting the activation of proliferation and hypertrophy of epithelial cells, is the onset of the expression of connexin group proteins and the formation of intercellular gap junctions (GJ) between the oocyte and follicular epithelium cells [11]. Due to these GJ, diffusion of ions, metabolites and potential signalling units (cAMP, Ca²⁺) into the oocyte and back to the follicular epithelium cells takes place. The synthesis of Cx-37, from which GJ are formed, the oocyte and the adjacent cells, starts immediately after selection of the primordial follicle for entry into growth.

It is also believed that protein substrates of the Cx-37 group are used by the oocyte for trophism, and subsequently, together with other regulatory

ликулярного эпителия [11]. Благодаря этим контактам осуществляется диффузия ионов, метаболитов и потенциальных сигнальных единиц (цАМФ, Ca^{2+}) в овоцит и обратно — к клеткам фолликулярного эпителия. Синтез Cx-37, из которого формируются GJ, овоцит и прилегающие к нему клетки начинают сразу после отбора примордиального фолликула для вступления в рост.

Полагают также, что белковые субстраты группы Cx-37 используются овоцитом для трофики, а в последующем совместно с другими регуляторными сигналами реиницируют мейоз. Как и в примордиальных фолликулах, овоциты первичных фолликулов пребывают в состоянии блока мейоза, несмотря на то, что рост половых клеток существенно активизируется.

В ходе формирования фолликулярной полости (кавитации) в клетках фолликулярного эпителия облигатно экспрессируется kit-лиганд, а в овоците — Cx-37. Если в регионе фолликула данные белки отсутствуют, полостной фолликул не развивается и возникают ановуляторные формы бесплодия.

В проведенном исследовании было выявлено усиление экспрессии Cx-37 в ооцитах полостных фолликулов на 7-е сутки, что является необходимым условием для нормального течения поздних стадий фолликулогенеза и характерно для доминантного фолликула до овуляции. Экспрессия протеина в фолликулярном эпителии первичных фолликулов снижается, однако не приводит к нарушению возобновления мейоза в ооците растущего фолликула [11].

На 15-е сутки эксперимента экспрессия BMP-15 в ооцитах всех типов растущих фолликулов наиболее выражена по сравнению с группой контроля и 7-ми сутками. Следует отметить появление значимо более высокой экспрессии BMP-15 в ооцитах уже со стадии примордиальных фолликулов, что согласуется со вступлением избыточного количества фолликулов в рост. Взаимодействие между ооцитами и фолликулярными эпителиоцитами антральных и преовуляторных фолликулов через щелевые контакты соответствует таковому в группе контроля.

На 30-е сутки опыта сохраняется высокая экспрессия BMP-15 в первичных фолликулах, что соотносится с завершением цикла фолликулогенеза. По данным литературы BMP-15 и Cx-37 являются протекторами клеток гранулёзы не только от апоптоза, но и от преждевременной лютеинизации [9, 10]. В проведенном исследовании экспрессия BMP-15 и Cx-37 в ооцитах вторичных и третичных фолликулов значимо не отличается от тако-

signals, meiosis is re-initiated. As in primordial follicles, the oocytes of the primary follicles are in a state of meiosis, despite significantly activated growth of germ cells.

During the formation of the follicular cavity (cavitation) in the cells of the follicular epithelium, the kit ligand is expressed, and Cx-37 is expressed in the oocyte. If these proteins are absent in the follicular region, the cavitory follicle does not develop and an ovulatory infertility forms arises.

The study revealed an increase in Cx-37 expression in cavitory follicles oocytes on the 7th day, which is a necessary condition for the normal course of the late stages of folliculogenesis and is characteristic of the dominant follicle before ovulation. Protein expression in the follicular epithelium of the primary follicles decreases but does not prevent the resumption of meiosis in the oocyte of the growing follicle [11].

On the 15th day of the experiment, the expression of BMP-15 in oocytes of all types of growing follicles is most pronounced compared to the control group and 7th day. A significantly higher expression of BMP-15 in oocytes from the stage of primordial follicles should be noted, which is consistent with the growth of excess follicles. The interaction between oocytes and follicular epithelial cells of antral and preovulatory follicles through gap junctions corresponds to that in the control group.

On the 30th day of the experiment, the high expression of BMP-15 was preserved in the primary follicles, which correlated with the completion of the folliculogenesis cycle. According to the studies, BMP-15 and Cx-37 protect granulosa cells not only from apoptosis but also from premature luteinization [9, 10]. In the study, the expression of BMP-15 and Cx-37 in the oocytes of the secondary and tertiary follicles is not significantly different from that in the control group but decreases compared to previous points of experience.

VEGF protein is one of the main stimulators of angiogenesis. It plays an important role in the physiology of normal ovaries and contributes significantly to the growth and development of functional ovarian cysts, mainly due to the induction of angiogenesis and increased vascular permeability [13]. The results obtained are consistent with published immunohistochemical studies that showed increased expression of VEGF in the wall of functional ovarian cysts [15]. Increased angiogenesis (increased expression of VEGF) in the early stages of modelling functional cysts is associated with in-

вой в группе контроля, но снижается по сравнению с предыдущими точками опыта.

Белок VEGF — один из основных стимуляторов ангиогенеза — играет важную роль в физиологии нормальных яичников и вносит значительный вклад в рост и развитие функциональных кист яичников, в основном за счет индукции ангиогенеза и повышения проницаемости сосудов [13]. Полученные результаты согласуются с опубликованными иммуногистохимическими исследованиями, показавшими повышенную экспрессию VEGF в стенке функциональных кист яичников [15]. Усиление процессов ангиогенеза (повышение экспрессии VEGF) в ранние сроки моделирования функциональных кист связано с усилением пролиферации фолликулоцитов, что является одним из звеньев патогенеза ФКЯ и ответом на стимуляцию фолликулярного эпителия ФСГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение бевацизумаба ускоряет регресс функциональных кист яичников за счет снижения васкуляризации в стенке кисты, сопровождающегося уменьшением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в стенке кисты. Выявленное снижение количества растущих фолликулов, усиление процессов атрезии в фол-

ликулах и изменение экспрессии факторов ово-соматического взаимодействия (BMP-15, Cx-37) имеют кратковременный характер.

CONCLUSION

Introduction of bevacizumab accelerates the regression of functional ovarian cysts by reducing vascularization in the cyst wall, accompanied by a decrease in the expression of vascular endothelial growth factor in the cyst wall. The revealed decrease in the number of growing follicles, the enhancement of atresia processes in the follicles, and the change in the expression of the oocyte-somatic interaction factors (BMP-15, Cx-37) are of short duration.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ликулах и изменение экспрессии факторов ово-соматического взаимодействия (BMP-15, Cx-37) имеют кратковременный характер.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сорокина И.В., Марковский В.Д., Борзенкова и др. Кистозные образования яичников у женщин: клинические и морфологические особенности // Морфология. 2015. Т. 9, № 2. С. 78–84.
2. Гасимова Д.М., Рухляда Н.Н. Клинико-анамнестические особенности пациенток с осложнениями доброкачественных опухолей и опухолевидных образований яичников // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2017. Т. 17, № 4. С. 72–77. doi: 10.17116/rosakush201717472-77.
3. Никогосян С.О., Кузнецов В.В., Загаштоков А.З. Экстренное и плановое лечение новообразований придатков матки // Акушерство и гинекология. 2017. № 6. С. 10–17. doi: 10.18565/aig.2017.6.10-6.
4. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции // Проблемы репродукции. 2010. Т. 16, № 5. С. 13–23.
5. Sanches F., Smitz J. Molecular control of oogenesis // Biochimica et Biophysica Acta. 2012. Vol. 1822. P. 1896–1912.
6. Erickson G.F., Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors // Fertil Steril. 2001. Vol. 76 (5). P. 943–949.
7. Зенкина В.Г., Солодкова О.А., Погукай О.Н., Каредина В.С. Современные представления об интраорганный регуляции фолликулогенеза в яичнике // Совр. проблемы науки и образования. 2012. № 2. С. 41.

REFERENCES

1. Sorokina I.V., Markovsky V.D., Borzenkova I.V. et al. (2015). Cystic formations of ovaries in women: clinical and morphological features. *Morphologia*, 9, 2, 78–84.
2. Gasymova D.M., Rukhlyada N.N. (2017). Clinical and anamnestic characteristics of patients with complications of benign tumors and tumor-like masses of the ovary. *Russ. Bull. Obstetr.-Gynecol.*, 17, 4, 72–77. doi: 10.17116/rosakush201717472-77.
3. Nikogosyan S.O., Kuznetsov V.V., Zagashnikov A.Z. (2017). Emergency and elective surgical management of tumors of the uterine appendages. *Obstetrics and Gynecology*, 6, 10–17. doi: 10.18565/aig.2017.6.10-6.
4. Boiarskii K.Iu., Gaidukov S.N. (2010). Folliculogenesis: from antral stage to ovulation (a review). *Russ. J. Human Reprod.*, 16, 5, 13–23.
5. Sanches F., Smitz J. Molecular control of oogenesis. (2012). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, 1896–1912.
6. Erickson G.F., Shimasaki S. (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil. Steril.*, 76, 5, 943–949.
7. Zenkina V.G., Solodkova O.A., Pogukay O.N., Karedina V.S. (2012). New concepts about regulation folliculogenesis inside ovary. *Modern Problems of Science and Education*, 2, 41.
8. Qinglei L., McKenzie L.J., Matzuk M.M. (2008). Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte

8. Qinglei L., McKenzie L.J., Matzuk M.M. Revisiting oocyte – somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence // *Mol. Hum. Reprod.* 2008. Vol. 14 (12). P. 673–678.
9. Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K. et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells // *Development*. 2008. Vol. 135 (1). P. 111–121.
10. Erickson G., Shimasaki S., Moore R. K. The role of the oocyte in folliculogenesis // *Trends Endocrinol. Metab.* 2000. Vol. 11. P. 193–198.
11. Richard S., Baltz J.M. Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex // *Biol. Reprod.* 2014. Vol. 90 (6): 137.
12. Козырева Е.В., Давидян Л.Ю. Роль факторов роста в патогенезе бесплодия и невынашивания беременности // *Совр. проблемы науки и образования*. 2015. № 4. С. 444.
13. Bilotas M., Meresman G., Buquet R., Sueldo C., Barañao R.I. Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls // *J. Reprod. Immunol.* 2010. Vol. 84 (2). P. 193–198. doi: 10.1016/j.jri.2009.12.002.
14. Ярмолинская М.И., Денисова В.М. Значение генитального эндометриоза в патогенезе бесплодия // *Журн. акушерства и женских болезней*. 2013. Т. 62, № 6. С. 67–77.
15. Кузнецова И.В. Роль ангиогенеза в патогенезе эндометриоза // *Акушерство и гинекология*. 2011. № 5. С. 16–22.
- developmental competence. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 12, 673–678.
9. Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K. et al. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135, 1, 111–121.
10. Erickson G., Shimasaki S., Moore R.K. (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11, 193–198.
11. Richard S., Baltz J.M. (2014). Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex. *Biol. Reprod.*, 90, 6, 137.
12. Kozyreva E.V., Davidyan L.J. (2015). The role of growth factors in the pathogenesis of infertility and miscarriage (literature review). *Modern Problems of Science and Education*, 4, 444.
13. Bilotas M., Meresman G., Buquet R., Sueldo C., Barañao R.I. (2010). Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *J. Reprod. Immunol.* 84, 2, 193–198. doi: 10.1016/j.jri.2009.12.002.
14. Yarmolinskaya M.I., Denisova V.M. (2013). Importance of genital endometriosis in pathogenesis of infertility. *J. Obstetrics and Women's Diseases*, 62, 6, 67–77.
15. Kuznetsova I.V. (2011). Role of angiogenesis in the pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*, 5, 16–22.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Волченко Дарья Александровна — аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск).

Тихоновская Ольга Анатольевна — д-р мед. наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск).

Мустафина Лилия Рамильевна — д-р мед. наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск).

Логвинов Сергей Валентинович — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск).

Образец цитирования: Волченко Д.А., Тихоновская О.А., Мустафина Л.Р., Логвинов С.В. Экспрессия факторов паракринной регуляции в яичниках крыс при коррекции экспериментальных функциональных кист яичников // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019. № 1. С. 67–77.

ABOUT THE AUTHORS

Volchenok Daria Aleksandrovna — Graduate Student of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University (Tomsk).

Tikhonovskaya Olga Anatolyevna — Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Siberian State Medical University (Tomsk).

Mustafina Liliya Ramilievna — Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University (Tomsk).

Logvinov Sergey Valentinovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University (Tomsk).

Citation example: Volchenok D.A., Tikhonovskaya O.A., Mustafina L.R., Logvinov S.V. (2019). Expression of paracrine regulation factors in rat's ovaries when correcting experimental functional ovarian cysts. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 67–77.