

УДК 615.25



ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГРУППОВОЙ ГОРМОН-РЕГУЛИРУЮЩЕЙ СИНХРОНИЗАЦИИ ОВУЛЯЦИИ У САМОК МЫШЕЙ

В.М. Покровский¹, Е.А. Патраханов¹, П.Р. Лебедев¹, А.В. Белашова¹, А.Ю. Карагодина¹,
А.А. Шабалин², А.В. Нестеров¹, В.А. Марковская¹, М.В. Покровский¹

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

² ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
305041, Россия, г. Курск, ул. К. Маркса, 3

E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

Получено 09.09.2020

Рецензия (1) 16.09.2020

Рецензия (2) 30.10.2020

Принята к печати 11.11.2020

Цель. Оценить эффективность гормон-регулирующей синхронизации овуляции у самок мышей, для увеличения количества одновременно оплодотворенных особей и получения потомства в запланированные сроки.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 180 самках мышей трех линий – СВА/лас, С57BL/6, BALB/c (n=60), разделенные на три подгруппы: интактные (спаривание без подтверждения фазы эструса) (n=20), цитологическое исследование вагинального секрета перед спариванием с определением фазы эструса (n=20), гормон-регулирующей синхронизации эстрального цикла с введением прогестерона (4,5 мг/100 г) на 1-е и простагландина F2α (0,083 мг/100 г) на 7-е сутки однократно от начала эксперимента с последующим немедленным спариванием (n=20). Запланированной датой родов считались 22 сутки с момента спаривания. Индекс синхронизации овуляции (ИСО) оценивался на 14 сутки с момента спаривания.

Результаты. На 14-й день с начала эксперимента индекс синхронизации овуляции в интактных группах линий СВА/лас, С57BL/6, BALB/c составил 25%, 25%, 40% соответственно. Количество беременных особей на 14 сутки, допущенных к спариванию после установленного эструса методом цитологической оценки вагинального секрета согласно ИСО, составило 65%, 60%, 75% соответственно. В экспериментальных группах ИСО составил 80%, 75%, 100% соответственно. На 22 сутки количество родивших самок линий СВА/лас, С57BL/6, BALB/c в интактных группах составило 3, 1, 3 особи, в контрольных 10, 6, 9, а в экспериментальной группе 16, 15, 17 что достоверно выше чем в контрольных и интактных группах (p<0,05).

Заключение. Гормон-регулирующая синхронизация овуляции у самок мышей достоверно увеличивает количество разродившихся особей на 22 сутки относительно синхронизированных по эструсу животных на 53% и интакта на 85,5%. Выявлено, что дополнительным эффектом гормональной синхронизации овуляции является увеличение количества приплода в 2,2 раза в сравнении с контрольными группами и в 3,9 раз в сравнении с интактными группами. Данный способ планирования родов рождения потомства экспериментальных животных сокращает временные затраты проведения доклинических исследований лекарственных препаратов по следующим видам оценки токсических эффектов: репродуктивная токсичность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на фертильность. Кроме того, данный способ расширяет возможности экспериментального моделирования патологий беременности и плода с последующей оценкой их фармакологической коррекции.

Ключевые слова. эстральный цикл, эструс, прогестерон, вагинальная цитология, синхронизация овуляции, простагландин F2α

ESTIMATION OF THE EFFICIENCY OF HORMONE-REGULATING SYNCHRONIZATION OF OVULATION IN FEMALE MICE

V.M. Pokrovsky¹, E.A. Patrakhanov¹, P.R. Lebedev¹, A.V. Belashova¹, A.Yu. Karagodina¹,
A.A. Shabalin², A.V. Nesterov¹, V.A. Markovskaya¹, M.V. Pokrovsky¹

¹ Belgorod State National Research University
85, Pobeda St., Belgorod, Russia, 308015

² Kursk State Medical University,
3, K. Marx St., Kursk, Russia, 305041

E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

Received 09 September 2020 Review (1) 16 September 2020

Review (2) 30 October 2020

Accepted 11 November 2020

Для цитирования: В.М. Покровский, Е.А. Патраханов, П.Р. Лебедев, А.В. Белашова, А.Ю. Карагодина, А.А. Шабалин, А.В. Нестеров, В.А. Марковская, М.В. Покровский. Оценка эффективности групповой гормон-регулирующей синхронизации овуляции у самок мышей. *Фармация и фармакология*. 2020;8(4):255-262. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-255-262

© В.М. Покровский, Е.А. Патраханов, П.Р. Лебедев, А. В. Белашова, А.Ю. Карагодина, А.А. Шабалин, А.В. Нестеров, В.А. Марковская, М.В. Покровский, 2020

For citation: V.M. Pokrovsky, E.A. Patrakhanov, P.R. Lebedev, A.V. Belashova, A.Yu. Karagodina, A.A. Shabalin, A.V. Nesterov, V.A. Markovskaya, M.V. Pokrovsky. Estimation of the efficiency of hormone-regulating synchronization of ovulation in female mice. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(4):255-262. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-255-262

The aim of the work is to assess the efficiency of hormone-regulating synchronization of ovulation in female mice, to increase the number of simultaneously fertilized individuals and obtain their offspring in the planned time frame.

Materials and methods. The study was carried out on 180 female mice of three lines – CBA/lac, C57BL/6, BALB/c (n = 60), divided into three subgroups: intact (mating without confirmation of the estrous phase) (n = 20), cytological examination of vaginal secretions before mating with the determination of the estrous phase (n = 20), hormone-regulating synchronization of the estrous cycle with the introduction of progesterone (4.5 mg/100 g) on the 1st and prostaglandin F2 α (0.083 mg/100 g) on the 7th day, once from the beginning of the experiment followed by immediate mating (n = 20). The planned date of delivery was considered the 22nd day from the moment of mating. The ovulation synchronization index (OSI) was assessed on the 14th day after mating.

Results. On the 14th day from the beginning of the experiment, the ovulation synchronization index in the intact groups of the CBA/lac, C57BL/6, BALB/c lines, was 25%, 25%, 40%, respectively. On the 14th day, the number of pregnant individuals admitted to mating after the established estrus by the method of cytological assessment of vaginal secretions according to OSI, was 65%, 60%, 75%, respectively. In the experimental groups, OSI was 80%, 75%, 100%, respectively. On the 22nd day, the number of delivered females of CBA/lac, C57BL/6, BALB/c lines in the intact group, was 3, 1, 3 individuals; in the control group – 10, 6, 9, and in the experimental group – 16, 15, 17, which is significantly higher than in the control and intact groups (p<0.05).

Conclusion. Hormone-regulating synchronization of ovulation in female mice significantly increases the number of delivered individuals on the 22nd day, relative to those synchronized by estrus by 53%, and to intact groups by 85.5%. It has been revealed that an additional effect of hormonal synchronization of ovulation is an increase in the number of offspring by 120% in comparison with the control groups and by 390% in comparison with the intact groups. This method of timing planning of the offspring birth of the experimental animals reduces the time spent on preclinical studies of drugs for the following types of assessment of toxic effects: reproductive toxicity, embryotoxicity, teratogenicity, effects on fertility.

Keywords: estrous cycle, estrus, progesterone, vaginal cytology, ovulation synchronization, prostaglandin F2 α

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, увеличивается темп работы лабораторий, основным модельным организмом которых являются мыши различных линий. Большую популярность, данный вид приобрел сравнительно недавно, и в результате усилий многих ученых на протяжении последних десятилетий было создано и поддерживается большое количество инбредных линий мышей. Эти события повлияли на дальнейшие исследования тем самым внесли огромный вклад в современные представления об иммунологии, онкологии, эмбриологии и нейробиологии [1].

Для подготовки беременных самок мышей к эксперименту группой авторов первоначально был опробован метод вагинальной цитологии. Данная методика основана на идентификации фаз эстрального цикла, с последующей выборкой особей, находящихся в фазе эструса и последующей подсадкой их к самцам [2].

Определение эструса у группы особей имеет важное значение в вопросе выборки животных с целью их последующего спаривания и получения потомства в экспериментальных целях [3]. Однако это требует длительного скрининга всей популяции животных, наличие у экспериментатора особых умений и знаний, что предполагает собой допущение ошибки. Вагинальная цитология – это неинвазивный и недорогой способ определения фазы цикла, требующий определенных навыков интерпретации морфологической картины клеток вагинального секрета. Этот метод утомителен и отнимает достаточное количество времени [4].

Групповая гормон-регулирующая синхронизация овуляции является очень популярной в скотоводстве. Основой данного метода является фармакологиче-

ская коррекция гормонального цикла с целью индукции овуляции в нужные сроки.

Используемый в предложенной схеме прогестерон обладает сильным антигонадотропным действием. Повышенный уровень прогестерона изменяет характеристику двух наружных слоев эндометрия. Происходит утолщение цервикальной слизи, что ведет к десинхронизации изменений эндометрия, необходимых для имплантации яйцеклетки и существенно подавляет проникновение сперматозоидов [5]. Уровень прогестерона достигает пика в середине секреторной фазы, снижая уровень ЛГ и ФСГ, вследствие чего вторичный ооцит не покидает доминирующий фолликул и не проходит в просвет фаллопиевой трубы. Указанные изменения делают невозможным оплодотворение яйцеклетки сперматозоидом.

Простагландин F2 α (PGF) является биологически сильнодействующим веществом, применение которого имеет важную роль в контроле репродукции. Применение препарата у крупного рогатого скота основано на его лютеолитических свойствах [6].

Кроме того, экспериментальные данные по крупному рогатому скоту указывают на то, что в периовуляторный период внутрифолликулярный простагландин необходим для процесса овуляции [7].

ЦЕЛЬ исследования – оценить количество случаев беременности у самок мышей подвергнутых гормон-регулирующей синхронизации овуляции, по сравнению с планированием сроков беременности и даты родов у животных с использованием определенной фазы эструса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был рассмотрен и одо-

брен на заседании комиссии по работе с лабораторными животными НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ». При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 года, правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 ЕС) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.).

Животные

Самки, вне зависимости от группы, рассаживались к самцам 2:1 соответственно. Запланированной датой родов считались 22 сутки с начала спаривания. Исключая племенную выборку для эксперимента, были отобраны самки мышей одинакового возраста и веса линий CBA/lac, C57BL/6, BALB/ в каждой по 60 особей, и самцы соответствующих линий в количестве 30 особей, полученные из питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская область, п. Столбовая).

Выбор особей данных линий обоснован наиболее частым их использованием в биомедицинских исследованиях [8].

Животные содержались в индивидуальных вентилируемых клетках. Подстилочным материалом служили нехвойные древесные опилки. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ЛБК-120 ГОСТ Р 50208-92. (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод»). Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода давалась *adlibitum* в стандартных поилках.

Дизайн исследования

Животные трех линий были разделены на три группы: интактные (естественное спаривание) (n=20), эстральная синхронизация (цитологическое исследование вагинального секрета перед спариванием с определением фазы эструса) (n=20), гормональная синхронизация эстрального цикла (n=20). Особи, относящиеся к контрольной группе, были отобраны в случае установления у них эструса. У самок интактной и экспериментальной группы предварительной выборки не проводилось. Самки, вне зависимости от группы, рассаживались к самцам 2:1 соответственно. Запланированной датой родов считались 22 сутки с начала спаривания.

В контрольных группах животные были допущены к спариванию после подтверждения у них фазы эструса путем оценки влагалищного секрета.

Для осуществления первого этапа гормональной синхронизации овуляции у мышей внутримышечно вводился прогестерон (суспензия для инъекций, ЗАО «Мосагроген», РФ) в дозе 4,5 мг/100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла самок. Через 7 суток

после введения прогестерона, осуществлялось внутримышечное введение простагландина F2α (ЗАО «Мосагроген», РФ) в дозе 0,083 мг / 100 г. Предполагаемое время наступления овуляции – 34–72 часа после введения второго препарата.

Оценка фармакологической коррекции эстрального цикла самок мышей проводилась путем исследования цитологической картины влагалищного секрета.

Индекс синхронизации овуляции рассчитывался по факту беременности на 14 сутки после начала спаривания. Индекс рождаемости анализировался по факту рождения.

$$ИСО = \frac{\text{Число оплодотворенных самок}}{\text{Число самок, подсаженных к самцам}} \times 100\%;$$

$$ИР = \frac{\text{Число потомства}}{\text{Число оплодотворенных самок}} \times 100\%$$

Вагинальный мазок/цитология

Манипуляция проводилась на следующий день после инъекции прогестерона, через 3 дня и непосредственно перед введением простагландина F2α и на следующий день после.

У фиксированной самки производится забор влагалищного секрета с целью цитологической оценки фазы эстрального цикла. Осторожно вводили во влагалище небольшое количество (20 мкл) дистиллированной воды с использованием пипетки с последующим втягиванием в пипетку ранее введенной жидкости. Данную процедуру повторяют 4–5 раз. Важно убедиться, что пипетка помещена на входе влагалищного канала и не проникает во влагалищное отверстие. Жидкость, содержащую несколько капель клеточной суспензии, после этого помещают на предметное стекло, высушивают на воздухе и окрашивают по методу Романовского-Гимзе [9, 10]. Затем предметное стекло накрывали покровным стеклом и немедленно исследовали количественно и качественный состав клеток секрета под световым микроскопом (Биомед 5) при увеличении 40х.

Влагалищный секрет состоит из трех типов клеток. Они включают лейкоциты, ороговевшие эпителиальные клетки и ядродержащие эпителиальные клетки. Оценка фазы эстрального цикла основана на доле этих клеток в вагинальном секрете [11].

Многочисленные округлые ядродержащие клетки, являющиеся однородными по размеру и внешнему виду, отличительный признак фазы проэструса (А). Фаза эструса демонстрирует обильные неядерные ороговевшие эпителиальные клетки (В). Ядродержащие эпителиальные клетки присутствуют в позднем метэструсе (С). Диэструс характеризуется наличием в поле зрения полиморфноядерных лейкоцитов и нескольких эпителиальных и ороговевших клеток [12].

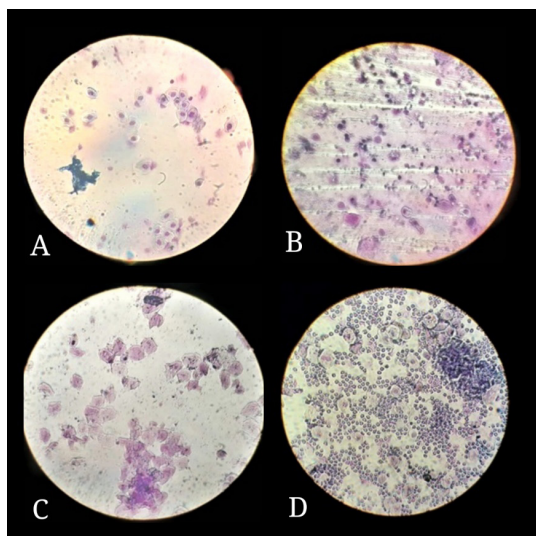


Рисунок 1 – Микроскопическая оценка капель клеточной суспензии влагалищного секрета у животных без проведения гормон-регулирующей синхронизации овуляции

Примечание: А – проэструс, В – эструс, С – метэструс, D – диэструс

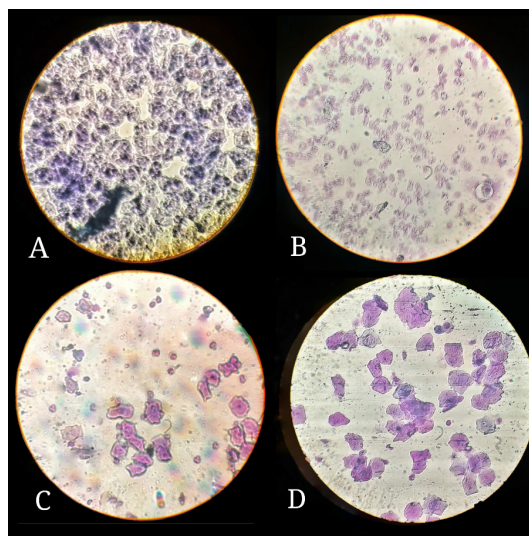


Рисунок 2 – Микроскопическая оценка капель клеточной суспензии влагалищного секрета у самок после проведения гормон-регулирующей синхронизации овуляции

Примечание: А – цитологическая картина содержимого влагалищного секрета на следующие сутки после введения прогестерона; В – на 3 сутки; С – на 7 сутки до введения простагландина F2α; D – на следующие сутки после введения простагландина F2α

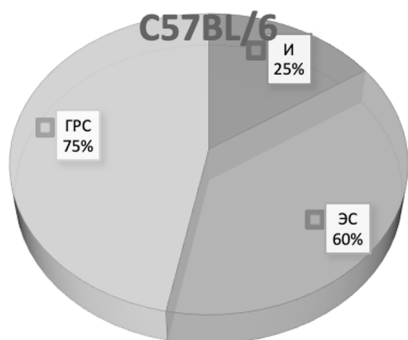


Рисунок 3 – Соотношение индекса синхронизации овуляции особей экспериментальных групп линии C57BL/6

Примечание: И – интактная группа; ЭС – эстральная синхронизация; ГРС – гормон-регулирующая синхронизация

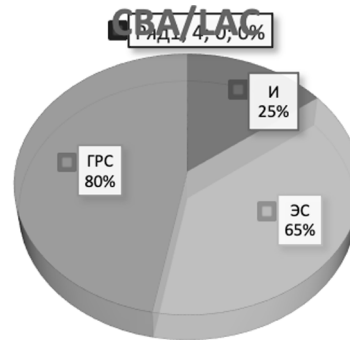


Рисунок 4 – Соотношение индекса синхронизации овуляции особей экспериментальных групп линии CBA/Jac

Примечание: И – интактная группа; ЭС – эстральная синхронизация; ГРС – гормон-регулирующая синхронизация.

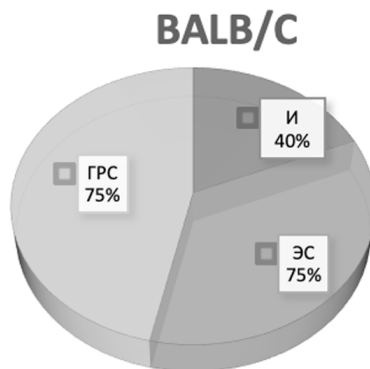


Рисунок 5 – Соотношение индекса синхронизации овуляции особей экспериментальных групп линии BALB/C

Примечание: И – интактная группа; ЭС – эстральная синхронизация; ГРС – гормон-регулирующая синхронизация.

Таблица 1 – Индекс синхронизации овуляции

| Название линии | Группы | CBA/lac | | | C57BL/6 | | | BALB/c | | |
|---|--------|---------|------|-------|---------|------|-------|--------|------|-------|
| | | (И) | (ЭС) | (ГРС) | (И) | (ЭС) | (ГРС) | (И) | (ЭС) | (ГРС) |
| Количество беременных самок на 14 сутки | | 5 | 13 | 16 | 5 | 12 | 15 | 8 | 15 | 20 |
| Количество самок, подсаженных к самцам | | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| ИСО% | | 25% | 65% | 80% | 25% | 60% | 75% | 40% | 75% | 100% |

Примечание: И – интактная группа; ЭС – эстральная синхронизация; ГРС – гормон-регулирующая синхронизация

Таблица 2 – Количество самок, разродившихся на 22 сутки

| Название линии | Интактная группа | CBA/lac(n=20) | C57BL/6(n=20) | BALB/c (n=20) |
|-----------------------------------|------------------|--------------------------|---------------|---------------|
| | | Эстральная синхронизация | 3 | 1 |
| Гормон-регулирующая синхронизация | 10* | 6* | 9* | |
| | 16* | 15* | 17* | |

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными группами и экспериментальными

Таблица 3 – Индекс рождаемости

| Название линии | Группы | CBA/lac | | | C57BL/6 | | | BALB/c | | |
|---|--------|---------|------|-------|---------|------|-------|--------|------|-------|
| | | (И) | (ЭС) | (ГРС) | (И) | (ЭС) | (ГРС) | (И) | (ЭС) | (ГРС) |
| Количество беременных самок на 14 сутки | | 5 | 13 | 16 | 5 | 12 | 15 | 8 | 15 | 20 |
| Количество потомства | | 34 | 77 | 145 | 28 | 67 | 126 | 74 | 123 | 193 |
| ИР, % | | 6,8 | 5,9 | 9,0 | 5,6 | 5,5 | 8,4 | 9,25 | 8,2 | 9,65 |

Гормональная регулирующая эстрального цикла

Для осуществления первого этапа гормональной синхронизации овуляции у мышей внутримышечно вводился прогестерон (суспензия для инъекций, ЗАО «Мосагроген», РФ «Прогестомат» рег. 32-3-4.15-2649 № ПВР-3-4.15/03139 от 27.06.2018) в дозе 4,5 мг/100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла самок. Через 7 суток после введения прогестерона, осуществлялось внутримышечное введение простагландина F2 α (ЗАО «Мосагроген», РФ «Магестрофан» рег. 32-3-4.15-2649 № ПВР-3-4.15/03139 от 11.06.15) в дозе 0,083 мг/100 г. Предполагаемое время наступления овуляции – 34–72 часа после введения второго препарата. Схема применения препаратов представлена в инструкции по ветеринарному применению лекарственных препаратов.

Статистический анализ

Статистический анализ сравнения числа случаев родов на 22 сутки в группах проводился с использованием критерия согласия Хи-2 Пирсона. Различия были определены на уровне значимости 0,05. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вагинальный мазок/цитология

На следующий день после инъекции прогестерона самке мыши (рис. 2) отмечается смешанная цитологическая картина, не позволяющая отнести видимый результат к определенной фазе цикла (А).

Полиморфноядерные лейкоциты и небольшое количество ороговевших клеток отмечается на 3 сутки после введения прогестерона, что соответствует фазе диеструса (В). На седьмые сутки перед введением простагландина F2 α , отмечается преобладание округлых ядросодержащих клеток с небольшим вкраплением между ними ороговевших эпителиальных клеток и полиморфноядерных лейкоцитов (С). Во влажном мазке, взятом на следующий день после инъекции простагландина F2 α отмечается преобладание обильных неядерных ороговевших эпителиальных клеток с клетками неправильной формы имеющих зернистую цитоплазму (D).

Гормон-регулирующая синхронизация эстрального цикла

В ходе исследования было установлено, что гормональная синхронизация группы самок увеличивает количество оплодотворенных особей на 55% относительно интактных групп и на 18,3% относительно контрольных групп. Отбор особей опирающийся на цитологическое исследование влажного секрета увеличивает количество беременных самок на 36% ($p < 0,05$) (таблица 1). Гормон-регулирующая синхронизация увеличивает вероятность родов самки на 22 сутки на 53% ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой и на 85,5% ($p < 0,05$) в сравнении с интактной группой (таблица 2). Соотношение индекса синхронизации овуляции представлено на рисунках 3,4,5.

В линии C57BL/6 в интактной группе на 14 сутки после спаривания беременность отмечалась у 25% самок. Эстральная синхронизация цикла увеличила

количество беременных особей относительно контроля на 35%. Гормон-регулирующая синхронизация овуляторного цикла увеличила количество оплодотворенных особей на 50% относительно интактной и на 10% относительно эстральной синхронизации ($p < 0,05$).

В линии СВА/лас в интактной группе на 14 суток после спаривания беременность отмечалась у 25% самок. Эстральная синхронизация цикла увеличила количество беременных особей относительно контроля на 40%. Гормон-регулирующая синхронизация овуляторного цикла увеличила количество оплодотворенных особей на 55% относительно интактной и на 15% относительно эстральной синхронизации ($p < 0,05$).

В линии СВА/лас в интактной группе на 14 суток после спаривания беременность отмечалась у 25% самок. Эстральная синхронизация цикла увеличила количество беременных особей относительно контроля на 35%. Гормон-регулирующая синхронизация овуляторного цикла увеличила количество оплодотворенных особей на 35% относительно интактной и не изменилось в эстральной синхронизации ($p < 0,05$).

Оценка индекса рождаемости

Количество потомства у экспериментальных животных разных групп неодинаково. В группах гормон-регулирующей стимуляции, среднее количество приплода у самок выше в сравнении с интактными и группами эстральной синхронизации (Таблица 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования подтвердили гипотезу о том, что гормон-регулирующая коррекция овуляторного цикла у самок мышей позволяет экспериментатору получить большее количество оплодотворенных особей в запланированные сроки с минимальной погрешностью в дате родов.

Согласно инструкции по ветеринарному применению лекарственного препарата «Прогестомат» и «Магестрофан», прогестерон ингибирует гипоталамо-гипофизарную систему, вследствие этого не происходит выделение гонадотропных гормонов – фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ), и в результате не происходит созревание фолликулов и овуляции.

Это приводит к индукции синтеза цервикальной слизи эпителиоцитами шейки матки, ее отеку в следствии увеличения ее кровоснабжения, а также приводит к разрастанию эндометрия и повышению растяжимости миометрия, снижает высвобождение гонадолиберина тем самым ингибируя новые овуляции, препятствуя созреванию фолликулов в яичниках, делает овуляцию невозможной. С шестого–седьмого дня происходит снижение концентрации прогестерона и эстрогена вызывая естественное увеличение ЛГ и ФСГ, а также увеличение содержания эстрогена в плазме крови.

Все фолликулы, растущие в виде когорты, имеют специфические рецепторы к ФСГ и нуждаются в гонадотропине, который необходим для их роста. На этой стадии растущие фолликулы не имеют достаточного количества рецепторов к ЛГ, чтобы ответить на стимуляцию, поэтому такую стадию роста часто именуют ФСГ-зависимой.

Второй этап гормон-регулирующей синхронизации овуляции начинается с введения на седьмые сутки простагландина F2 α . Основное действие данного биологически активного вещества, заключается в стимуляции перехода эстрального цикла из фазы диэструса в эструс путем преодоления прогестероновой блокады цикла. Кроме того, простагландин F2 α способствует развитию фолликулогенеза, синтезу эстрогенов и как следствие наступлению эструса. Простагландин F2 α поддерживает лютеинолиз вызванный всплеском ЛГ, что приводит к овуляции и выбросу яйцеклеток из доминантного фолликула в течение 16–32 ч.

Во время овуляции, которая происходит примерно через 34–36 ч после всплеска ЛГ, вторичный ооцит в метафазе II покидает доминирующий фолликул и проходит в просвет фаллопиевой трубы, где он может быть оплодотворен [12].

Всплеск лютеинизирующего гормона (ЛГ) стимулирует преовуляторные фолликулы к образованию местных аутокринных и паракринных медиаторов, которые координируют сложные внутри- и внеклеточные молекулярные механизмы, впоследствии вызывая овуляцию и лютеинизацию. К ключевым локальным медиаторам относят прогестерон и его ядерный рецептор (PGR), простагландины (PTG) (PGE2 и PGF2 α).

Повышение уровня ЛГ увеличивает продукцию прогестерона и экспрессию PGR в перивуляторных фолликулах, что необходимо для успешной овуляции на различных моделях животных [13]. Например, блокирование биосинтеза прогестерона [14], ингибирование активности PGR химическими ингибиторами [15, 16] или нокаут генов, кодирующих синтез PGR [17, 18], приводили к ановуляции на различных экспериментальных моделях животных.

Все вышеперечисленные изменения приводят к наступлению овуляции на 8–9 день после проведения первого этапа гормон-регулирующей синхронизации овуляции.

Подтвержден факт того, что выборка животных для спаривания, основанная на цитологической картине фазы эстрального цикла увеличивает количество оплодотворенных особей, однако разброс даты родов составлял 2–4 дня, что осложняет планирование экспериментального протокола изучения фармакологической коррекции патологии беременности. Известны модели, в которых препарат вводят в различные сроки беременности, изучая его влияние на различные периоды внутриутробного развития

плода: с 1 по 6 (доимплантационный период), с 6 по 16 (органогенез), и с 16 по 19 дни беременности (фетогенез) [19]. В данном случае разброс даты родов в 2–4 дня является проблемой, которая должна быть минимизирована. По нашим наблюдениям дату подсадки самок к самцам сразу после инъекции простагландина F2 α можно считать первым днем беременности, так как через 21–22 дня после проведения двухэтапной гормон-регулирующей синхронизации эструса у 80% самок наступили роды, тогда как в группе эстральной синхронизации в заданные сроки родоразрешились только 42% самок.

Кроме того, количество плодов, родившихся у самок, индукция овуляции у которых была искусственной, на 30% выше в сравнении с естественной. Мы предполагаем, что это обусловлено повышенным выбросом в кровь рилизинг гормонов гипоталамо-гипофизарной системы что стимулирует выход большего количества яйцеклеток из яичников в овуляцию [20].

Используемые в данной схеме препараты по степени воздействия на организм относятся к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007). При подкожном или внутримышечном введении препарата Прогестамаг, необходимый экзогенный уровень прогестерона в крови для проявления терапевтического действия поддерживается в течение 6–7 суток, но не превышает при этом физиологическое содержание в организме животных. При применении препарата Магэстрофан в соответствии с инструкцией побочных явлений и осложнений у сельскохозяйственных животных, как правило, не наблюдается.

Таким образом введение прогестерона самке мыши в дозе 4,5 мг/100 г стимулирует переход фазы овуляторного цикла в секреторную фазу овуляторного цикла самки. Последующее введение простагландина F2 α в дозе 0,083 мг/100 г через 34–36 часов обеспечивает высвобождение ЛГ, что стимулирует выход вторичного ооцита в просвет фаллопиевой трубы, где он может быть оплодотворен.

Предложенная схема имеет на наш взгляд следующие преимущества:

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Это исследование не получило какого-либо конкретного гранта от финансирующих учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Применение комбинированной гормон-регулирующей синхронизации овуляции оправданно при проведении доклинических исследований эмбриотоксичности лекарственных препаратов ввиду отсутствия токсических эффектов используемых компонентов на плод.

Точное прогнозирование даты родов позволяет минимизировать риски задержки исследования, позволяет рационально планировать эксперимент.

Последовательное введение двух препаратов с довольно длительным интервалом, минимизирует трудозатраты и существенно облегчает планирование дальнейшего эксперимента.

Учитывая факт принятия первого дня беременности особи с момента спаривания, открываются перспективы исследования патологий доимплантационного периода, органогенеза, фетогенеза, внутриутробных патологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гормональная стимуляция овуляции у самок мышей достоверно увеличивает количество разродившихся особей на 22 сутки относительно группы контроля с цитологическим подтверждением фазы эструса и интактной группы. Данный способ планирования сроков рождения потомства экспериментальных животных сокращает временные затраты проведения доклинических исследований лекарственных препаратов по следующим видам оценки токсических эффектов: репродуктивная токсичность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на фертильность. Кроме того, данный способ расширяет возможности экспериментального моделирования патологий беременности и плода с последующей оценкой их фармакологической коррекции.

Таким образом, введение прогестерона самке мыши в дозе 4,5 мг/100 г стимулирует переход фазы овуляторного цикла в секреторную фазу овуляторного цикла самки. Последующее введение Простагландина F2 α в дозе 0,083 мг/100 г через 34–36 часов обеспечивает высвобождение ЛГ, что стимулирует выход вторичного ооцита в просвет фаллопиевой трубы, где он может быть оплодотворен.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Åhlgren J., Voikar V. Experiments done in Black-6 mice: what does it mean? *Lab Anim (NY)*. 2019. V. 48, N 6. P. 171–180. DOI: 10.1038/s41684-019-0288-8
2. Mayer B., Stahl V., Kron M. The use of gatekeeping procedures in the statistical planning of animal experiments. *Altern Lab Anim*. 2017. V. 45, N 6. P. 317–328. DOI: 10.1177/026119291704500608
3. McLean A.C., Valenzuela N., Fai S., Bennet S.A. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation or mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 2012.V. 15, N 67. e4389.
4. Ekambaram G., SKS K., Joseph L.D. Comparative Study on the Estimation of Estrous Cycle in Mice by Visual and Vaginal Lavage Method. *J Clin Diagnostic Res*. 2017. V. 11, N 1. AC05–AC07.
5. Regidor P.A. Clinical relevance in present day hormonal contraception. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2018. V. 37, N 1. DOI:10.1515/hmbci-2018-0030
6. C.E.P. Leonardi L.F.M., Pfeifer M.I.B., Rubin J., Singh R.J., Mapletoft G.A., Pessoa A.M., Bairy C.A.M. Silva. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers *Theriogenology*. 2012. V. 78, N 7. P. 1578–82. DOI: 10.1016/j.theriogenology
7. Pinaffi F.L.V., Araujo E.R., Ginther O.J. Role of luteal biosynthesis of prostaglandin F2 α on function and structure of the corpus luteum during luteolysis in heifers. *Domest Anim Endocrinol*. 2018. N 63. P.10–14. DOI: 10.1016/j.domaniend
8. Auta T., Hassan A.T. Alteration in oestrus cycle and implantation in *Mus musculus* administered aqueous wood ash extract of *Azadirachta indica* (neem) *Asian Pacific J Reproduction*. 2016. V. 5, N 3. P. 188–192. DOI: 10.1016/j.apjr.2016.03.003
9. Гайдай Е.А., Гайдай Д.С. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля. Лабораторные животные для научных исследований. 2019. – № 4. – 9 с. DOI: 10.29926/2618723X-2019-04-09
10. Achiraman S., Archunan G., Sankar Ganesh D., Rajagopal T., Rengarajan R.L., Kokilavani P., Kamalakkannan S., Kannan S. Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection. *Zool Sci*. 2011. N 28. P. 600–605. DOI: 10.2108/zsj.28.600
11. Barret K.E., Barman S.M., Boitano S., Brooks H.L. Reproductive development and function of the female reproductive system. In: Ganong's review of medical physiology. 24th edition, McGraw Hill Education.
12. Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol*. 2015. V. 43. P. 776–793. DOI: 10.1177/0192623315570339
13. Barbieri R.L. The endocrinology of the menstrual cycle. *Methods Mol Biol*. 2014. V. 1154. P. 145–169. DOI: 10.1007/978-1-4939-0659-8_7
14. Robker R.L., Akison L.K., Russell D.L. Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nucl Recept Signal*. 2009. V. 7. e012.
15. Snyder B.W., Beecham G.D., Schane H.P. Inhibition of ovulation in rats with epostane, an inhibitor of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1984. V. 176. P. 3238–242.
16. Loutradis D., Bletsas R., Aravantinos L., Kallianidis K., Michalakis S., Psychoyos A. Preovulatory effects of the progesterone antagonist mifepristone (RU486) in mice. *Hum Reprod*. 1991. V. 6, N 9. P. 1238–1240.
17. Pall M., Mikuni M., Mitsube K., Brännström M. Time-dependent ovulation inhibition of a selective progesterone-receptor antagonist (Org 31710) and effects on ovulatory mediators in the in vitro perfused rat ovary. *Biol Reprod*. 2000. V. 63, N 6. P. 1642–1647.
18. Robker R.L., Russell D.L., Espey L.L., Lydon J.P., O'Malley B.W., Richards J.S. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. V. 97, N 9. P. 4689–4694.
19. Bishop C.V., Hennebold J.D., Kahl C.A., Stouffer R.L. Knockdown of progesterone receptor (PGR) in macaque granulosa cells disrupts ovulation and progesterone production. *BiolReprod*. 2016;94(5):109.
20. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию // Изд-во М.: Фармакологический комитет, 1986. – 25 с.
21. Довжикова И.В., Луценко М.Т. Современные представления о роли прогестерона (обзор литературы) // Бюл. физ. и пат. дых. 2016. Т. 1, № 60.

АВТОРЫ

Владимир М. Покровский – студент 5-го курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

Евгений А. Патраханов – студент 5-го курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-8415-4562. E-mail: pateval7@gmail.com

Петр Р. Лебедев – студент 5-го курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-9102-3360. E-mail: Artkeit@yandex.ru

Анастасия В. Белашова – студентка 4-го курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Анастасия Ю. Карагодина – студентка 5-го курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский

государственный национальный исследовательский университет». ORCID: 0000-0001-9440-5866

Алексей А. Шабалин – студент 5-го курса ФГБОУ ВО «Курский медицинский университет». ORCID 0000-0002-1867-7074

Аркадий В. Нестеров – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Вера А. Марковская – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Михаил В. Покровский – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID: 0000-0002-2761-6249. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru