

УДК 616-092.18+576.385

В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, О.А. Шепель, Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

ЗМІНИ ПАРАМЕТРІВ МЕЙОТИЧНОГО ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ І ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ЇХ ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ

Оцінювали параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення за умов експериментального імунного ушкодження і введення Л-норваліну та етилметилгідроксипіридин сукцинату (ГС). Встановлено, що за умов імунізації бичачою сироваткою альбуміну (БСА) введення: 1) 4-ГК, як і ГС, зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II відповідно в 1,2 і 1,4(4-ГК) та 1,1 і 1,4 (ГС) рази у порівнянні з величинами в групі імунізація БСА; 2) Л-норваліну + ГС зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I в 1,1 рази у порівнянні з величинами групи імунізація БСА + ГС. Показано, що за умов імунізації БСА введення: 1) 4-ГК вірогідно не впливає на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів; 2) ГС зумовлює зниження загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів, а саме збільшується кількість живих клітин, і зменшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу відповідно в 1,2 та 3,5 рази у порівнянні з величинами групи імунізації БСА; 3) Л-норваліну + ГС призводить до збільшення клітин з морфологічними ознаками некрозу в 2,3 рази у порівнянні з величинами групи імунізації БСА.

Ключові слова: експериментальне імунне пошкодження, мейотичне дозрівання ооцитів, клітини фолікулярного оточення ооцитів, апоптоз, некроз.

Системні запальні процеси впливають на органи репродуктивної системи, зокрема на скоротливість матки [1, 2], що може призводити до порушення імплантації та передчасних пологів, а також бути однією з причин безпліддя.

Імунізація самок мишей введенням бичачого сироваткового альбуміну (БСА) призводить до запуску імунозапальної відповіді, що характеризується активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, а саме антигенспецифічних лімфоцитів, також відбувається зсув лейкоцитарної формули вліво, збільшуються індекс активації нейтрофілів, функціонально-метаболічна активність клітин неспецифічної резистентності та продукція біологічно активних речовин [3].

Однак можливі за таких умов розлади мейотичного дозрівання ооцитів, а також зміни параметрів життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів залишаються недостатньо вивченими.

Метою даної роботи було оцінити зміну мейотичного дозрівання ооцитів (метафази I

та II) і кількості клітин фолікулярного оточення ооцитів з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу за умов імунізації БСА і введення: блокатора ферменту полі(АДФ-рибозо)полімерази-1(ПАРП-1)-4-гідроксиквіназоліну (4-ГК); антиоксиданту – етилметилгідроксипіридин сукцинату (ГС); блокатора аргінази II – Л-норваліну.

Матеріал і методи. Дослідження проведено з використанням невагітних самиць мишей лінії СВА масою 16–20 г. При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи.

Для моделювання системного імунно-комплексного ушкодження тварин імунізували зростаючою дозою антигену – БСА (150–300 мг/кг маси миші, Sigma, США) [4]. Тварин було поділено на п'ять груп: 1-ша – контроль (в/в введення ізотонічного розчину натрію хлориду замість БСА згідно схеми імунізації, n=8); 2-га – імунізація БСА (1 раз в тиждень зростаючою дозою антигену (150, 175, 200, 250, 250, 300 мг/кг, n=8); 3-тя – введення

© В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, О.А. Шепель та ін., 2016

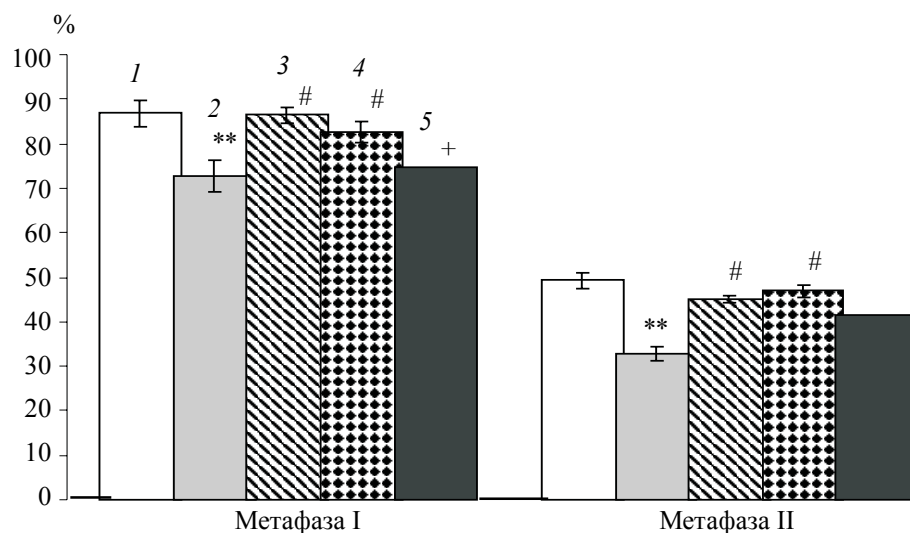
тваринам, що імунізувалися БСА, блокатора ферменту полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 (ПАРП-1) 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК, в/о, в дозі 100 мг/кг, двічі на тиждень, при співпадінні з імунізацією – за 1 год до БСА, n=9); 4-та – введення тваринам, що імунізувалися БСА, антиоксиданту етилметилгідроксипіридин сукцинату (ГС, в/о, раз на тиждень, 100 мг/кг) згідно схеми імунізації (n=8); 5-та – введення тваринам, що імунізувалися БСА, блокатора аргінази II Л-норваліну за умов дії ГС (шестикратно, в/в, раз на тиждень, 50 мг/кг, в день після введення БСА і ГС згідно схеми імунізації, n=8).

На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники. Ооцити від мишей однієї групи збирали та розподіляли в окремі камери. Усі контрольні та експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 400 мкл культурального середовища DME з 15 мМ NEPER, температура 37 °С, тривалість 20 год). Морфологічні дослідження ооцитів проводили під мікроскопом МБС-10. Після 2 год культивування підраховували ооцити (% до загальної кількості), що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), а після 20 год – на стадії метафази II (формування першого полярного тільця).

Шляхи клітинної загибелі вивчали за допомогою методу прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 та Йодид пропідіуму. Оцінювали не менш як 200 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Люам І-1» (ЛОМО, Росія) з водно-імерсійним об'єктивом x85 і відеосистемою передачі зображення на комп'ютер. Отримані дані статистично обробили з використанням t-критерію Стьюдента; достовірними вважали значення $p < 0,05$ ($10 \geq n \geq 4$, n – кількість незалежних дослідів з трьома/чотирма групами/повторами, а також за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим міжгруповим порівнянням середніх значень за тестом Ньюмана-Кеулса. Перевірку даних на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова-Смирнова та порівнювали середні. Всі дані, виражені у відсотках, перед статистичним аналізом були піддані арксинус-перетворенню Фішера.

Результати. Дані про вплив введення 4-ГК(4-гідроксиквіназоліну), ГС (етилметилгідроксипіридин сукцинату) та Л-норваліну за умов імунізації БСА на показники мейотичного дозрівання ооцитів представлено на рисунку.

Імунізація БСА призводить до пригнічення параметрів мейотичного дозрівання



Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза I та метафаза II): 1 – контроль; 2 – імунізація бічачим сироватковим альбуміном; 3 – імунізація БСА+4-ГК; 4 – імунізація БСА+ГС; 5 – імунізація БСА+ГС+Л-норвалін.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ – вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізації БСА; + $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізації БСА і введення ГС

ооцитів як на стадії розчинення зародкового пухирця (метафаза I), так і на стадії формування першого полярного тільця (метафаза II).

Встановлено, що за умов імунізації БСА введення 4-ГК, як і введення ГС, покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II по відношенню до величин групи імунізації. Проте введення Л-норваліну + ГС за умов імунізації БСА зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I у порівнянні з величинами в контролі та в групі імунізації БСА + ГС.

Дані про вплив введення 4-ГК, ГС і Л-норваліну за умов імунізації БСА на параметри життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів наведені в таблиці.

Частка клітин фолікулярного оточення ооцитів з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу за умов імунізації БСА, введення 4-ГК, ГС і Л-норваліну у мишей, (M±m) %

Група тварин	Живі клітини	Апоптоз	Некроз
Контроль (n=9)	83,00±1,52	8,11±1,76	8,89±1,39
Імунізація БСА (n=8)	66,13±2,75**	22,00±2,56**	11,87±2,29
Імунізація БСА+4-ГК (n=9)	69,67±1,26	21,22±2,67	9,11±2,47
Імунізація БСА+ГС (n=9)	79,31±2,34 [#]	6,36±1,06 [#]	14,33±1,63
Імунізація БСА+ГС+Л-норвалін (n=8)	67,12±1,81	5,88±0,99 [#]	27,00±1,60 [#]

Примітка. * p<0,05; **p<0,01 – вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # p<0,05; – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізації БСА.

Імунізація БСА призводить до посилення клітинної загибелі фолікулярного оточення ооцитів і збільшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу.

За умов імунізації БСА введення 4-ГК вірогідно не впливає на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів; введення ГС зумовлює зниження загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів і зменшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу в порівнянні з відповідними величинами в групі імунізації; введення Л-норваліну + ГС призводить до збільшення клітин з морфологічними ознаками некрозу.

Обговорення результатів. Відомо, що реакція організму на запалення, незалежно від локалізації запального процесу, розвивається відповідно до загальних типових патологічних процесів, за участю багаточисельних медіаторів запалення. До цієї групи входить безліч активних хімічних сполук: цитокіни (прозапальні і протизапальні), інтерферони, ейкозаноїди, активні радикали кисню, компонент плазми крові, біологічно активні речовини і стресові гормони (гістамін, серо-

тонін, катехоламіни, кортизол, вазопресин, простагландини, гормон росту), фактор активації тромбоцитів, монооксид азоту (NO) та ін [5].

Надмірна продукція цитокінів і інших медіаторів запалення (NO, ейкозаноїдів тощо) викликає порушення регулювальної функції імунної системи, призводить до їх безконтрольного виділення не лише у вогнищі запалення, але й в циркулюючій крові, і веде до порушення балансу між прозапальними і протизапальними цитокінами на користь прозапальних [6, 7].

При підвищеній продукції прозапальних цитокінів концентрація NO може в 1000 разів перевищувати нормальні показники. Надмірне накопичення NO спричиняє вазодилатацію,

підвищення проникності судинної стінки для макромолекул, інтерстиційний набряк, розлади мікроциркуляції, які відіграють основну роль у порушенні тканинної оксигенації [8–10].

Таким чином, медіатори запалення із чинників, що захищають організм, стають пошкоджувальними, порушуючи мікроциркуляторну систему органів і тканин за межами первинного вогнища запалення, і починає розвиватися синдром системної реакції на запалення, що веде за собою порушення функції на органному і системному рівнях.

Нами вперше встановлено, що за умов імунізації БСА введення 1) 4-ГК, як і введення ГС, зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії як метафази I, так і метафази II відповідно в 1,2 і 1,4(4-ГК) та 1,1 і 1,4 (ГС) рази у порівнянні з величинами в групі імунізації БСА, 2) Л-норваліну + ГС зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I в 1,1 рази у порівнянні з величинами групи імунізації БСА + ГС. Показано, що за умов імунізації БСА введення 1) 4-ГК вірогідно не

впливає на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів; 2) ГС зумовлює зниження загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів, а саме збільшується кількість живих клітин, і зменшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу відповідно в 1,2 та 3,5 разів у порівнянні з величинами групи імунізації БСА; 3) Л-норваліну + ГС призводить до збільшення клітин з морфологічними ознаками некрозу в 2,3 раза у порівнянні з величинами групи імунізації БСА.

Ми вважаємо, що імунізація БСА спричиняє секрецію потужних вазоактивних і прозапальних чинників, зокрема, збільшується генерація активних форм кисню та експресія індукцибельної NO-синтази, що призводить до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [11] з наступним збільшенням клітинної загибелі, що в сукупності призводить до посилення запальних процесів на системному рівні, і тому відбувається пошкодження функцій органів репродуктивної системи, що узгоджується з даними про пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів і посилення загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів за апоптичним і некротичними шляхами за умов імунізації мишей гомогенатом алогенних яєчників [12].

Спираючись на отримані нами результати, а також на дані літератури, є підстави стверд-

жувати, що імунізація БСА призводить до системного запального процесу з пошкодженням клітин фолікулярного оточення і пригніченням параметрів мейотичного дозрівання ооцитів.

Висновки

1. За умов імунізації бичачою сироваткою альбуміну введення: 1) 4-ГК, як і ГС, зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II; 2) Л-норваліну + ГС зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I.

2. За умов імунізації бичачою сироваткою альбуміну введення: 1) 4-ГК вірогідно не впливає на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів; 2) ГС зумовлює зниження загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів і зменшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу; 3) Л-норваліну+ГС призводить до збільшення клітин з морфологічними ознаками некрозу.

Оцінка життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів ставить завдання в подальших дослідженнях оцінити інтегральну цілісність їх генома і очікувати підтвердження гіпотези про те, що імунізація бичачою сироваткою альбуміну може змінювати активність експресії генів, асоційованих з репарацією, що відображається як однострунковий розрив ДНК.

Література

1. Вознесенська Т.Ю. Функціонування органів репродуктивної системи в умовах експериментального імунного ушкодження яєчника у мишей / Т.Ю. Вознесенська, О.М. Калейнікова, Т.В. Блашків // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – № 2. – С. 125–128.
2. Моделювання хронічного запалення яєчників / Н.О. Волкова, М.С. Юхта, Т.О. Юрчук та ін. // Патологія. – 2014. – № 1. – С. 100–104.
3. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунокомплексного генезу у мишей / С.І. Павлович, А.П. Литвиненко, Н.В. Макогон та ін. // Вісник морфології. – 2014. – № 2. – С. 496–500.
4. Пат. № 93351 МПК(2014.01)А 61В 5/00, Україна. Спосіб моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей / Макогон Н.В., Вознесенська Т.Ю., Павлович С.І. та ін. // Заявка u201404698 від 25.09.2014. Бюл. № 18.
5. Серова В.В. Воспаление: Руководство для врачей / В.В. Серова, В.С. Паукова. – Москва: Медицина, 1995. – 640 с.
6. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection / E.F. McKinney, J.C. Lee, D.R. Jayne et al. // Nature. – 2015. – Published online 2015 Jun 29. doi: 10.1038/nature14468
7. Balk R.A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? / R. A. Balk // Virulence. – 2014, Jan 1. – № 5 (1). – P. 20–26.
8. Оксид азоту: клініко-діагностичне значення показників метаболізму у дітей з ревматоїдним артритом / І.В. Дудка, Л.І. Омельченко, А.Г. Ципкун та ін. // Перинатология и педиатрия. – 2006. – № 3. – С. 109–111.

9. Сывороточный альбумин при синдроме системной воспалительной реакции / Г.В. Родоман, Т.И. Шалаева, Г.Е. Добрецов и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 2. – С. 62–64.
10. Поздний гестоз как системная воспалительная реакция / Д.Н. Киншт, Е.И. Верещагин, Н.М. Пасман и др. // Вестник интенсивной терапии. – 1999. – № 2. – С. 23–28.
11. Retinol, β -carotene and oxidative stress in systemic inflammatory response syndrome / C. Nogueira, F. Borges, E. Lameu et al. // Rev. Assoc Med Bras. – 2015, Mar-Apr. – Vol. 61 (2). – P. 116–120.
12. Протективна дія молсидоміну при імунній патології яєчників у мишей / Н.В. Макогон, Т.Ю. Вознесенська, Т.М. Бризгіна та ін. // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 5. – С. 29–34.

В.А. Срибная, Н.Г. Грушка, О.А. Шепель, Т.Ю. Вознесенская, Т.В. Блашкив
ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ МЕЙОТИЧЕСКОГО СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ИХ Фолликулярного окружения в условиях экспериментального иммунного повреждения

Оценивали параметры мейотического созревания ооцитов и жизнеспособности клеток их фолликулярного окружения в условиях экспериментального иммунного повреждения и введения Л-норвалина и этилметилгидроксипиридин сукцината (ГС). Установлено, что в условиях иммунизации бычьим сывороточным альбумином введение: 1) 4-КГ, как и введение ГС, приводит к улучшению параметров мейотического созревания ооцитов как на стадии метафазы I, так и на стадии метафазы II соответственно в 1,2 и 1,4 (4-ГК) и 1,1 и 1,4 (ГС) раза по сравнению с величинами в группе иммунизация БСА; 2) Л-норвалина + ГС приводит к угнетению мейотического созревания ооцитов на стадии метафазы I в 1,1 раза по сравнению с величиной группы иммунизация БСА + ГС. Показано, что в условиях иммунизации БСА введение: 1) 4-ГК достоверно не влияет на жизнеспособность клеток фолликулярного окружения ооцитов; 2) ГС приводит к снижению гибели клеток фолликулярного окружения ооцитов, а именно увеличивается количество живых клеток и уменьшается количество клеток с морфологическими признаками апоптоза соответственно в 1,2 и 3,5 раза по сравнению с величинами группы иммунизации БСА; 3) Л-норвалина + ГС приводит к увеличению клеток с морфологическими признаками некроза в 2,3 раза по сравнению с величинами группы иммунизации БСА.

Ключевые слова: экспериментальное иммунное повреждение, мейотическое созревание ооцитов, клетки фолликулярного окружения ооцитов, апоптоз, некроз.

V.O. Sribna, N.G. Grushka, O.A. Shepel, T.Yu. Voznesenska, T.V. Blashkiv
OOCYTE MEIOTIC MATURATION AND VIABILITY OF FOLLICULAR CELLS SURROUNDING THE OOCYTE IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNE FAILURE

It was evaluated the changes of oocyte meiotic maturation (metaphase I and metaphase II) and viability of the follicular cells surrounding the oocyte in conditions of experimental immune failure and treatment of HS and L-norvaline. It has been observed that BSA immunization and treatment of 1) 4-HQ, as well as HS, improve oocyte meiotic maturation both metaphase I and metaphase II in, respectively, 1.2 and 1.4 (4-HQ) times and in, respectively, 1.1 and 1.4 (HS) times compared with values in the BSA immunization group; 2) L-norvaline+HS lead to inhibition of oocyte meiotic maturation at metaphase in 1.1 times compared with values in the group of BSA immunization+HS. It was shown that BSA immunization and treatment of 1) 4-HQ did not significantly affect follicular cells surrounding the oocyte viability; 2) HS reduce cell death of follicular cells surrounding the oocyte, namely the number of living cells increases and the number of cells with the morphological features of apoptosis reduces in, respectively, 1.2 and 3.5-times compared with the values of the BSA immunization group; 3) L-norvaline+HS increase the number of cells with morphological signs of necrosis in 2.3 times compared with the values of the BSA immunization group.

Key words: experimental immune failure, oocyte meiotic maturation, follicular cells surrounding the oocyte, apoptosis, necrosis.

Поступила 08.02.16