

Т.Ю. Вознесенська, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, І.М. Алексєєва

Вплив інгібітора активації NF- κ B куркуміну на оогенез і загибель фолікулярних клітин при імунному ушкодженні яєчників мишей

*В експерименті на мишах лінії СВА вивчали вплив інгібітора активації ядерного транскрипційного фактора κ B (NF- κ B) куркуміну (речовини рослинного походження – *Curcuma longa*) на мейотичне дозрівання ооцитів і загибель фолікулярних клітин через апоптоз і некроз при імунному ушкодженні яєчників, викликаному імунізацією тварин антигеном алогенного яєчника. NF- κ B відіграє ключову роль у регуляції транскрипції генів, які кодують прозапальні чинники (цитокіни, молекули адгезії, індукційні NO-синтазу та циклооксигеназу), а також регулює проліферацію і загибель клітин. Встановлено, що імунізація мишей посилювала загибель фолікулярних клітин через апоптоз і некроз, призводила до розвитку запальних процесів в організмі (за лейкограмою крові) і порушувала мейотичне дозрівання ооцитів у метафазі I і II. Інтрагастральне введення куркуміну ("Sigma", США) в дозі 2 мг на тварину 4 рази на тиждень протягом усього періоду імунізації призводило до зниження кількості фолікулярних клітин, що гинули через апоптоз і, особливо, некроз, до послаблення запальних процесів та до покращення оогенезу.*

Ключові слова: яєчник, імунне запалення, мейотичне дозрівання ооцитів, фолікулярні клітини, апоптоз, некроз, куркумін.

ВСТУП

Аутоімунні захворювання жіночої репродуктивної системи, особливо яєчників, широко розповсюджені та негативно позначаються на народжуваності [7, 14, 16, 18]. Аутоімунне ушкодження яєчників – типовий процес імунного запалення, найважливішим механізмом якого є дія прозапальних і антизапальних чинників. Останнім часом у виникненні аутоімунних захворювань велику увагу приділяють ядерним транскрипційним факторам, зокрема κ B (NF- κ B). Він відіграє критичну роль в активації транскрипції генів, що кодують прозапальні чинники (цитокіни, молекули адгезії, індукційні NO-синтазу та циклооксигеназу), а також регулює проліферацію і загибель клітин [13, 21]. Саме тому як в експерименті, так і в клініці є спроби вико-

ристовувати блокатори активації NF- κ B при лікуванні запальних процесів. Серед інгібіторів активації NF- κ B найбільш поширеним є куркумін – речовина рослинного походження (*Curcuma longa*). Встановлено, що він інгібує експресію генів цитокінів, які продукуються Т-хелперами [10]. Куркумін регулює як проліферацію, так і апоптоз Т-лімфоцитів людини і щурів, тобто він діє на спільні сигнальні шляхи клітинного росту та загибелі [20]. Показано, що при деяких аутоімунних захворюваннях (ревматоїдний артрит, псоріаз, хвороба Альцгеймера) він послаблює запальні процеси [6, 8, 9]. Кількість праць щодо ефективності його застосування в медицині з року в рік зростає. Але невідомо, чи не призведе блокада NF- κ B, який впливає на велику кількість біохімічних процесів в організмі, до погіршення ситуації, тим більше, що

© Т.Ю. Вознесенська, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, І.М. Алексєєва

багато так званих прозапальних чинників відіграють суттєву фізіологічну роль. Питання про ефективність і доцільність анти-NF- κ B-терапії потребує подальшого вивчення.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив куркуміну на мейотичне дозрівання ооцитів і загибель фолікулярних клітин через апоптоз і некроз при імунному ушкодженні яєчників у мишей.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самиць мишей лінії СВА масою 18–22 г. при дотримуванні положень Конвенції з біоетики Ради Європи (Страсбург, 1986).

Імунне ушкодження яєчників викликали імунізацією антигеном алогенного яєчника. Для отримання антигена використовували яєчники білих безпородних мишей. На першому етапі мишей імунізували підшкірно гомогенатом алогенного яєчника (1,5–2,0 мг білка на тварину) в повному ад'юванті Фрейнда. Надалі антиген у зростаючих дозах вводили внутрішньовенно (0,5 мг; 0,75 мг; 1,0 мг білка на тварину) через 2 доби на 3-тю. Через 6 діб після останнього введення антигена тварин наркотизували, декапітували, яєчники і кров використовували для досліджень. Куркумін, суспендований у соняшниковій олії, вводили інтрагастрально в дозі 2 мг на тварину 4 рази на тиждень протягом всієї імунізації. Було досліджено 3 групи мишей: 1-ша група – контроль: введення за схемою імунізації фізіологічного розчину та інтрагастральне введення соняшникової олії; 2-га – імунізація антигеном алогенного яєчника та інтрагастральне введення розчинника куркуміну – соняшникової олії; 3-тя – куркумін на тлі імунізації: імунізація та інтрагастральне введення куркуміну, суспендованого в соняшниковій олії.

Для дослідження мейотичного дозрівання ооцитів з яєчників виділяли зрілі

фолікули, тобто великі фолікули, які містили багато шарів фолікулярних клітин та яйцеклітину з вираженою прозорою оболонкою та визначали їх кількість. Кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси культивували протягом 20 год у культуральному середовищі DME з 5 % ембріональної телячої сироватки при 37 °С. Після культивування протягом 4 год підраховували кількість ооцитів, що перебували на стадії метафази I – розчинення зародкового пухирця, після культивування протягом 20 год – кількість ооцитів, що перебували на стадії метафази II – формування першого полярного тільця.

Оцінку апоптотичної і некротичної загибелі фолікулярних клітин проводили одразу після їх виділення з яєчника за морфологічними ознаками. Морфологічну оцінку вважають «золотим стандартом» вивчення апоптозу, оскільки не всі біохімічні показники виявляються при деяких його видах або і при некротичній загибелі. Використовували метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот – Хехст 33342 і йодидом пропідіуму [2]. Цей метод дає можливість визначити кількість живих, апоптотичних, первинно- і вториннонекротичних клітин. Йодид пропідіуму проникає лише в клітини з ушкодженими мембранами (тобто некротичні) або клітини з ушкодженням плазматичної мембрани на різних стадіях розвитку апоптозу (вторинний постапоптотичний некроз) і забарвлює їх ядра в оранжевий колір. Хехст 33342 проникає також через неушкоджені мембрани та забарвлює ядра живих і апоптотичних клітин в зелено-синій колір. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні риси ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: периферичне розташування хроматину, його конденсацію, пікноз і фрагментацію ядер, а також розпад клітин на апоптотичні тільця. Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Люмам II-1 з

водно-імерсійним об'єктивом $\times 85$. Використовували відеосистему передачі зображення з мікроскопа на комп'ютер. Визначали відсоток живих, апоптотичних, первинно- і вториннонекротичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин.

Статистичну обробку результатів експериментів проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступним порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмана–Кейлса з використанням програми Statistica.6; $P < 0,05$ вважалось статистично вірогідним. Перед статистичним аналізом до всіх результатів, виражених у відсотках, застосовували арксинус-перетворення за Фішером [1]. При визначенні зв'язків між показниками використовували лінійний кореляційний аналіз за Пірсоном [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імунізація мишей антигеном аlogenного яєчника викликала суттєве ушкодження яєчників. Виявлено значне зменшення кількості виділених з яєчника фолікулів з $15,9 \pm 0,6$ в контролі до $8,1 \pm 0,3$ при імунізації ($P < 0,001$). Виявлялися ооцити з атиповою морфологією (з нерівномірно гранульо-

ваною цитоплазмою та ознаками її фрагментації). Спостерігалася деградація частини фолікулярних клітин. Суттєво порушувався оогенез (рис. 1): зменшувався відсоток ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (метафаза I) та формували перше полярне тільце (метафаза II). Пригнічення оогенезу супроводжувалося зменшенням кількості живих фолікулярних клітин і збільшенням кількості клітин, що гинули через апоптоз і некроз (рис 2, 3). У лейкограмі крові відбувалися зміни, що свідчили про розвиток запалення – підвищувався відсоток нейтрофільних гранулоцитів, в тому числі паличкоядерних нейтрофілів (загальне число нейтрофілів: контроль – $26,0 \% \pm 3,2 \%$; імунізація – $33,3 \% \pm 2,0 \%$, паличкоядерні: контроль – $3,2 \% \pm 0,4 \%$; імунізація – $7,4 \% \pm 0,8 \%$; $P < 0,001$).

Застосування куркуміну суттєво поліпшувало мейотичне дозрівання ооцитів на стадії метафази I і II (див. рис. 1). Також посилювалася життєздатність фолікулярних клітин, пригнічуючи як апоптоз, так і некроз (див. рис. 2, 3). Слід відмітити значний антинекротичний ефект куркуміну, який призвів до збільшення співвідношення апоптоз/некроз: за умов самої імунізації – $6,2 \pm 0,9$ та при застосуванні куркуміну –

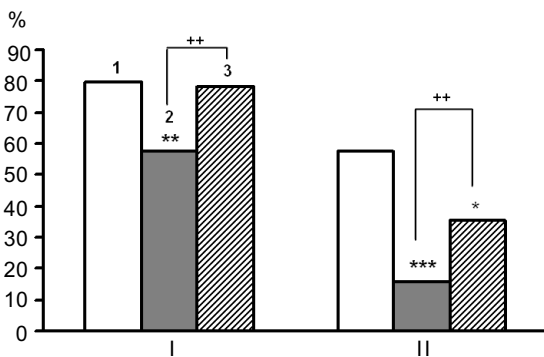


Рис. 1. Зміни мейотичного дозрівання ооцитів мишей під впливом куркуміну за умов імунного ушкодження яєчників: I – метафаза I, II – метафаза II; 1 – контроль, 2 – імунізація, 3 – куркумін на тлі імунізації. За віссю ординат – відсоток від загальної кількості клітин.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ відносно контролю; ++ $P < 0,01$ відносно імунізації

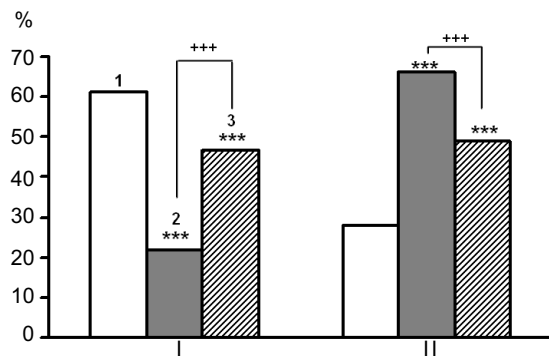


Рис. 2. Зміни кількості живих та апоптотичних фолікулярних клітин під впливом куркуміну за умов імунного ушкодження яєчників: I – живі клітини, II – апоптоз; 1 – контроль, 2 – імунізація, 3 – куркумін на тлі імунізації. За віссю ординат – відсоток від загальної кількості клітин. *** $P < 0,001$ відносно контролю; +++ $P < 0,001$ відносно імунізації

10,8±0,7 (P<0,001). Суттєвим було також зменшення вторинного постапоптотичного некрозу: контроль – 5,3 % ± 0,9 %; імунізація – 14,8 % ± 1,1 % (P<0,001); куркумін на тлі імунізації – 10,3 % ± 0,6 % (P<0,05).

Проведений кореляційний аналіз виявив негативний лінійний зв'язок між загибеллю фолікулярних клітин і здатністю ооцитів до відновлення мейозу за умов введення куркуміну на тлі імунізації антигеном алогенного яєчника (таблиця). Це свідчить

на користь припущення, що протективна дія куркуміну на оогенез опосередковується, принаймні частково, його позитивним впливом на життєздатність фолікулярних клітин. Під впливом куркуміну знижувався відсоток паличкоядерних нейтрофілів у крові, який був підвищений внаслідок імунізації (контроль – 3,2 % ± 0,4 %; імунізація – 7,4 % ± 0,8 %, P<0,001; куркумін на тлі імунізації – 3,6 % ± 0,5 %; P<0,001).

Коефіцієнти кореляції показників некротичної й апоптотичної загибелі фолікулярних клітин (X) і кількості ооцитів на стадії метафази I (Y) та рівняння лінійної регресії за умов введення куркуміну на тлі імунізації антигеном алогенного яєчника

Показник оогенезу	Показник клітинної загибелі	Коефіцієнт кореляції	Вірогідність коефіцієнта кореляції (P)	Рівняння лінійної регресії
Відсоток ооцитів на стадії метафази I (Y)	відсоток апоптозу (X)	-0,62	<0,01	Y=96,3-0,5*X
	відсоток некрозу (X)	-0,48	<0,05	Y=87,5-1,7*X

Одержані результати свідчать про те, що імунне ушкодження яєчників відбувається на рівні дозрівання ооцитів і виживання фолікулярних клітин. Вірогідний негативний кореляційний зв'язок між загибеллю фолікулярних клітин і мейотичним дозріванням ооцитів є вагомим аргументом на користь їх причинно-наслідкових взаємо-

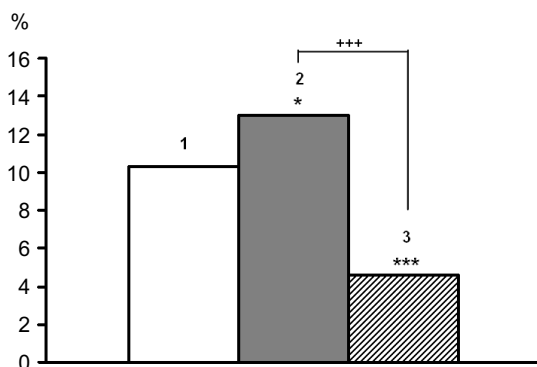


Рис. 3. Зміни кількості некротичних фолікулярних клітин під впливом куркуміну за умов імунного ушкодження яєчників: 1 – контроль, 2 – імунізація, 3 – куркумін на тлі імунізації. За всією ординат – відсоток від загальної кількості клітин.

* P<0,05, *** P<0,001 відносно контролю; +++ P<0,001 відносно імунізації

відносин, показуючи, що зменшення загибелі фолікулярних клітин може бути причиною поліпшення оогенезу. Застосування інгібітора активації NF-κB куркуміну на тлі імунізації, який поліпшував оогенез і зменшував загибель фолікулярних клітин як через апоптоз, так і некроз, показує, що центральний регулятор експресії прозапальних чинників відіграє суттєву роль в імунному ушкодженні яєчників. Його роль може реалізуватися через посилення експресії прозапальних цитокінів насамперед фактора некрозу пухлин-α (ФНП-α). Застосування інгібіторів NF-κB можна вважати різновидом антицитокінової, в тому числі анти ФНП-α-терапії. В терапії такого роду при ушкодженні яєчників міститься і деяка загроза, оскільки цитокіни, зокрема ФНП-α, відіграють важливу фізіологічну роль у розвитку фолікулів, їх атрезії, овуляції, функціонуванні жовтого тіла, стероїдогенезі [3, 5, 12]. Одержані в нашій роботі результати про позитивний ефект інгібітора активації NF-κB куркуміну на оогенез при імунному ушкодженні

яєчників свідчить про доцільність такої терапії. Не менш суттєвим компонентом участі NF- κ B у розвитку імунного запалення є його вплив на клітинний гомеостаз. Відомо, що активація цього транскрипційного фактора може призводити як до виживання, так і до загибелі клітин залежно від типу клітин, їх функціонального стану та наявності інших сигналів активації [11, 13, 19]. Наші результати показали, що інгібіція активації NF- κ B куркуміном при імунному ушкодженні яєчників сприяє виживанню фолікулярних клітин внаслідок зменшення їх апоптотичної та некротичної загибелі, що забезпечує поліпшення оогенезу. Важливий ефект куркуміну – зменшення кількості фолікулярних клітин, загиблих через некроз, оскільки саме він значною мірою ініціює імунний запальний процес внаслідок виходу в навколишнє середовище внутрішньоклітинних антигенів, до яких не толерантна імунна система. Доказом цього в наших дослідженнях є послаблення запалення під впливом куркуміну (за лейкограмою крові).

Більшість даних літератури відносно механізму дії куркуміну свідчить про його здатність блокувати деградацію інгібітора NF- κ B і, таким чином, перешкоджати активації фактора і його транслокації із цитоплазми в ядро [4, 8, 15, 17]. Показано, що куркумін пригнічує експресію генів прозапального цитокіну ФНП- α , індукцибельних циклооксигенази, NO-синтази і ліпоксигенази, а також модулює проліферацію і апоптоз клітин, що може бути наслідком його впливу на активацію NF- κ B [4, 6, 8, 15, 17]. Відомо також, що куркумін діє як антиоксидант [15, 17], що може розширювати спектр його позитивного впливу при запальних процесах.

Таким чином, дослідження дії інгібітора активації NF- κ B куркуміну при імунному ушкодженні яєчників у мишей, яке відповідає окремим рисам аутоімунних процесів у жінок, свідчать про участь NF- κ B в імунному запаленні яєчника, в розвит-

ку якого суттєву роль відіграє загибель клітин через апоптоз і, особливо через некроз, а також про доцільність використання інгібіторів його активації як терапевтичні засоби.

**Т.Ю. Вознесенская, Т.М. Брызгина,
В.С. Сухина, Н.В. Макогон, И.Н. Алексеева**

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАЦИИ NF- κ B КУРКУМИНА НА ООГЕНЕЗ И ГИБЕЛЬ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИММУННОМ ПОРАЖЕНИИ ЯИЧНИКОВ МЫШЕЙ

В эксперименте на мышах линии СВА изучали влияние ингибитора активации ядерного транскрипционного фактора κ B (NF- κ B) куркумина (вещества растительного происхождения – *Curcuma longa*) на мейотическое созревание ооцитов и гибель фолликулярных клеток по апоптотическому и некротическому пути при иммунном поражении яичников, вызванном иммунизацией животных антигеном аллогенного яичника. NF- κ B играет ведущую роль в регуляции транскрипции генов, кодирующих провоспалительные факторы (цитокины, молекулы адгезии, индуцибельные NO-синтазу и циклооксигеназу), а также регулирует пролиферацию и гибель клеток. Показано, что иммунизация мышей увеличивала гибель фолликулярных клеток по апоптотическому и некротическому пути, что приводило к развитию воспалительного процесса в организме (по результатам лейкограммы крови) и нарушало мейотическое созревание ооцитов в метафазе I и II. Интрагастральное введение куркумина («Sigma», США) в дозе 2 мг на животное в период иммунизации снижало количество фолликулярных клеток, гибнущих по апоптотическому, а особенно по некротическому пути, ослабляло воспалительный процесс в организме и способствовало менее выраженному нарушению оогенеза.

Ключевые слова: яичник, иммунное воспаление, мейотическое созревание ооцитов, фолликулярные клетки, апоптоз, некроз, куркумин.

**T.Voznesenskaya¹, T. Bryzgina, V. Sukhina,
N. Makogon, I. Alexeyeva**

THE INFLUENCE OF AN INHIBITOR OF NF- κ B ACTIVATION CURCUMIN ON THE OOGENESIS AND FOLLICULAR CELL DEATH IN IMMUNE OVARIAN FAILURE IN MICE

In experiments on CBA mice, we studied the influence of an inhibitor of nuclear transcription factor κ B activation curcumin, obtained from *Curcuma longa*, on the meiotic maturation of oocytes and apoptotic and necrotic death of follicular cells at

immune ovary failure induced by immunization of animals with allogenic ovarian extracts. NF- κ B plays a pivotal role in the induction of genes encoding pro-inflammatory factors (cytokines, adhesion molecules, inducible NO-synthase and cyclooxygenase) and in regulation of cell proliferation and death. It has been shown that immunization of mice increased the death of follicular cells through an apoptotic and necrotic pathways, which led to inflammatory response (according to blood leukogram and impairment the oocyte meiotic maturation at metaphase I and II). Intragastric administration of curcumin (Sigma, USA, 2mg of the mouse weight, four times a week during the period of immunization) reduced the number of the follicular cells died through apoptotic and especially necrotic pathway. Curcumin attenuated an inflammatory response and improved the meiotic maturation of oocytes impaired under experimental immune ovarian failure in mice.

Key words: ovarium, immune ovary failure, meiotic maturation of oocytes, follicular cells, apoptosis, necrosis, curcumin.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

Ukrainian Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
2. Макогон Н.В., Вознесенська Т.Ю., Бризгіна Т.М., Сухіна В.С., Грушка Н.Г., Алексєєва І.М. Протективна дія молсидоміну при імунній патології яєчників у мишей // Фізіол. журн. – 2007. – **53**, №5. – С. 29–34.
3. Останин А.А., Айзикович Б.И., Айзикович И.В., Кожин А.Ю., Черных Е.Р. Роль цитокинов в регуляції репродуктивної функції // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – **143**, № 1. – С. 81–85.
4. Aggarwal S., Ichikawa H., Takada Y., Sandur S.K., Shishodia S., Aggarwal B. Curcumin (diferuloylmethane) down regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation // Mol. Pharmacol. – 2006. – **69**, № 1. – P. 195–206.
5. Bornstein S.R., Rutkowski H., Kreras J. Cytokines and steroidogenesis // Mol. Cell Endocrinol. – 2004. – **215**, № 1–2. – P. 135–141.
6. Bright J. Curcumin and autoimmune disease // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – **595**. – P. 425–451.
7. Forges T., Monnier-Barbarino P., Faure G.C., Bene M.C. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology // Hum. Reprod. Update. – 2004. – **10**. – P. 163–175.
8. Hatcher H., Planalp R., Cho J. Torti F.M., Torti S.V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – **65**, № 11. – P. 1631–1652.
9. Hsu C.H., Cheng A.L. Clinical studies with curcumin // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – **595**. – P. 471–480.
10. Kang B., Song Y., Kim K., Choe Y.K., Hwang S.Y., Kim T.S. Curcumin inhibits cytokine profile in CD 4+ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages // Brit. J. Pharm. – 1999. – **128**. – P. 380–384.
11. Kimura M., Haisa M., Uetsuka H., Takaoka O., Ohkawa T., Kawashima R., Yamatsuji T., Gundur M., Kaneda Y., Tanaka N., Naomoto Y. TNF combined with IFN- α accelerates NF- κ B – mediated apoptosis through enhancement of Fas expression in colon cancer cells // Cell Death Differ. – 2003. – **10**, № 6. – P. 718–728.
12. Kiyoshi O., Ryosuke S. Multiple role of TNF superfamily member in corpus luteum function // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – **1**. – P. 95–105.
13. Kurylovicz A., Nauman J. The role of nuclear factor κ B in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment // Acta biochemica Polonica. – 2008. – **55**, № 4.
14. Luborsky J. Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies // J. Women's Health and Gender Based Medicine. – 2002. – **11**. – P. 585–599.
15. Maheshwari R.K., Singh A.K., Gaddipati J., Srimal R.C. Multiple biological activities of curcumin: A short review // Life Sciences- 2006. – **78**. – P. 2081–2087.
16. Pandedkar T.D., Wadia P. Autoimmune disorders of the ovary // Ind. J. Exp. Biol. – 1998. – **36**, № 5. – P. 433–436.
17. Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M., Vergara P., Moreno M.G., Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B proinflammatory cytokines production and oxidative stress // Biochem. Biophys. Acta. – 2007. – **1770**. – P. 989–996.
18. Santoro N. Research on the mechanisms of premature ovarian failure // J. Gynecol. Investig.-2002. – **8**, № 1. – P. 10–12.
19. Shen H-M., Pervaiz S. TNF receptor superfamily – induced cell death: redox – dependent execution //

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: voz@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 23.11.2009*