

Роль сиртуїнів у змінах функціонального стану ооцитів та клітин їх фолікулярного оточення в умовах системного аутоімунного ушкодження у мишей

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: mariastupchuk@yahoo.com

Вивчали вплив активатора сиртуїнів (ресвератрол) на функціональний стан ооцитів та клітин їх фолікулярного оточення при моделюванні експериментального системного аутоімунного ушкодження імунізацією мишей лінії СВА антигеном нирки. Встановлено суттєве ушкодження яєчників мишей, вірогідне зменшення кількості зрілих фолікулів, що були виділені з них, та збільшення кількості ооцитів із атиповою морфологією. Показано, що за експериментальних умов при культивуванні значно зменшувалася відсоток ооцитів, які розчиняли зародковий пухирець та формували перше полярне тільце. Пригнічення функції яєчників супроводжувалося суттєвими змінами життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів. При культивуванні ооцитів у середовищі з ресвератролом у концентрації 20 мкмоль/л виявлено збільшення відсотка клітин, що розчиняли зародковий пухирець, на 12,2% порівняно із групою без впливу ресвератролу, а ооцитів, що формували перше полярне тільце, – на 17,4%. Відзначали також збільшення кількості живих клітин у фолікулярному оточенні ооцитів на 10,5% і зменшення числа таких клітин із морфологічними ознаками апоптозу на 6,4% та некрозу на 4,1% порівняно із культивуванням без ресвератролу.

Ключові слова: мейотичне дозрівання ооцитів; апоптоз; некроз; ресвератрол; системне аутоімунне ушкодження.

ВСТУП

Безпліддя є однією із актуальних проблем у жінок репродуктивного віку з аутоімунними розладами [1,2]. Останнім часом з'явилося чимало наукових досліджень, присвячених їх ролі у патогенезі різних гінекологічних захворювань, зокрема, недостатності яєчників [3]. Одним із основних факторів, що сприяють розвитку первинної недостатності яєчників, за сучасними уявленнями, прийнято вважати аутоімунний гломерулонефрит. Він являє собою серйозну проблему для репродуктивного здоров'я жінок. У репродуктивних розладах у жінок, включаючи безпліддя, залучені окисний стрес та надлишкові активні форми кисню [4, 5]. Збільшення активних форм кисню може сприяти атрезії фолікулів та старінню ооцитів в яєчниках. У пошуках стратегій, спрямованих на запобігання окисного уш-

кодження яєчників, активно вивчається роль сиртуїнів [6, 7]. Вони є експресованими в овульованих ооцитах, їх експресія поступово зменшується від запліднення до стадії бластоцисти у мишей [7, 8]. Інтерес до вивчення ролі сиртуїнів у репродуктивній фізіології зростає протягом останніх років, а оцінка репродуктивного статусу (менструальної функції, здатності до зачаття, перебігу вагітності та пологів) у пацієток із аутоімунним гломерулонефритом рідко була предметом особливої уваги, тому досі є актуальною. Етіологію цього розладу можна дослідити на моделях з використанням тварин. Один із методів моделювання аутоімунних захворювань, зокрема і гломерулонефриту, базується на імунізації – інтенсивному впливі антигенного стимулу.

Мета нашої роботи – дослідження впливу активатора сиртуїнів на функціональний стан

ооцитів (мейотичне дозрівання) і клітин їх фолікулярного оточення (апоптоз і некроз) при моделюванні системного аутоімунного ушкодження за допомогою імунізації мишей антигеном нирки.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА, які були надані віварієм Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Всі тварини на початку експерименту були віком 2–2,5 міс і масою 18–20 г. При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи (Страсбург, 1986). Миші були поділені на групи по 12 тварин у кожній. До I контрольної групи ввійшли тварини, яким вводили фізіологічний розчин, до II – миші з модельованим системним аутоімунним ушкодженням, до III – тварини з модельованим системним аутоімунним ушкодженням та впливом ресвератролу.

Модель системного аутоімунного ушкодження (гломерулонефрит) відтворювали за допомогою імунізації мишей I покоління суспензією антигена нирки, отриманої від материнської особи. Нирку подрібнювали в стерильному гомогенізаторі протягом 10 хв, потім переносили суспензію в центрифужну пробірку, центрифугували на холоді 3-кратно по 3 хв (2000 об/хв), кожен раз видаляли супернатант, осад що утворився обережно переносили на стерильну фольгу та зважували. Для приготування антигенної суспензії брали осад і змішували з повним ад'ювантом Фрейнда («Sigma», США), який використовується для посилення імунної відповіді. Імунізацію тварин проводили з розрахунку 10 мкл суспензії на 10 г маси тіла за наступною схемою: 3-разове з інтервалом в 1 день внутрішньоочеревинно раз на добу. Повторно імунізацію проводили через 3 тиж одноразово внутрішньоочеревинно у тій самій дозі. Перед початком і під час експерименту оцінюва-

ли об'єктивний статус тварин та вміст білка у сечі. Забір експериментального матеріалу (яєчники) здійснювали під ефірним наркозом на 3-тю добу після останнього введення. З них неферментативно (механічно) виділяли ооцити. Оцінювали стан зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми, а саме щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Після 2 год культивування підраховували кількість ооцитів (у відсотках до загальної кількості), що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), після 20 год культивування підраховували ооцити, що перебували на стадії метафази II (сформованого першого полярного тільця), а також ооцити з атиповою морфологією (нерівномірно гранульованою цитоплазмою та ознаками фрагментації останньої).

Для оцінки клітинної загибелі та диференціації ядер живих, некротичних та апоптотичних клітин фолікулярного оточення ооцитів був використаний метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот. Після виділення клітин проводили їх морфологічну оцінку рутинним методом виключення барвника – трипанового синього (0,2%-ий розчин на 0,9%-ий NaCl). Підрахунок живих та мертвих клітин здійснювали в камері Горяєва. Забарвлення флуоресцентними барвниками проводили в натрій-фосфатному буфері (phosphate buffered saline, PBS). Клітини інкубували в темряві у термостаті при 37°C за наявності ядерних барвників (Propidium iodid та Benzimide H33342) у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л протягом 10 хв, з подальшим двократним відмиванням клітин у PBS під час центрифугування (2000 об/хв, 7 хв) з наступною фіксацією 5%-м формаліном в PBS (2 хв). Забарвлені клітини відмивали в PBS, ресуспендували і робили мазки. Живі, некротичні та апоптотичні клітини підраховували не менш ніж 200 одиниць за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Люмам И-1» з водно-імерсійним об'єктивом x85 та окуляром x5.

Розподіл отриманих результатів на нормальність перевіряли за тестом Колмогорова–Смирнова. У разі нормального розподілу статистичну обробку результатів при порівнянні значень двох груп проводили з використанням критерію t Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, США); $P < 0,05$ вважали статистично вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать про суттєве ушкодження яєчників мишей при моделюванні системного аутоімунного ушкодження за допомогою імунізації мишей антигеном нирки. Так, у тварин виявлено ($P < 0,001$) зменшення кількості зрілих фолікулів, що виділені з яєчника (великих фолікулів з яйцеклітиною з вираженою прозорою оболонкою та оточеною багатьма шарами фолікулярних клітин). Після імунізації (порівняно з контролем) кількість ооцитів з атиповою морфологією збільшувалася. Також у тварин з моделюванням системного аутоімунного ушкодження спостерігалася деградація фолікулярних клітин. При культивуванні суттєво зменшувався відсоток ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець та формували перше полярне тільце (рис. 1).

У разі культивування ооцитів тварин із системним аутоімунним ушкодженням у середовищі з активатором сиртуїнів ресвератролом збільшувався відсоток ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець та формували перше полярне тільце. У тварин II групи, без впливу ресвератролу, відсоток ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець, становив $36,8 \pm 5,1\%$, у тварин III групи - $48,6 \pm 6,9\%$. Число ооцитів, що сформували перше полярне тільце у II групі групи було $23,6 \pm 4,3\%$, а для III - $41,0 \pm 5,0\%$ ($P < 0,05$; рис.2.).

Таким чином, в умовах системного аутоімунного ушкодження пригнічується мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro* на обох стадіях. Дія ресвератролу покращувала показники мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II відносно значень у групі імунізованих тварин.

В організмі ооцит підтримує тісний зв'язок з фолікулярними клітинами, які його оточують, через клітинні контакти – перехідні проміжки, які забезпечують надходження речовин, необхідних для метаболічних процесів в ооциті, що є вирішальним для його росту і розвитку. За фізіологічних умов, що супроводжують оогенез (атрезія фолікулів, овуляція, вилучення аутореактивних лімфо-

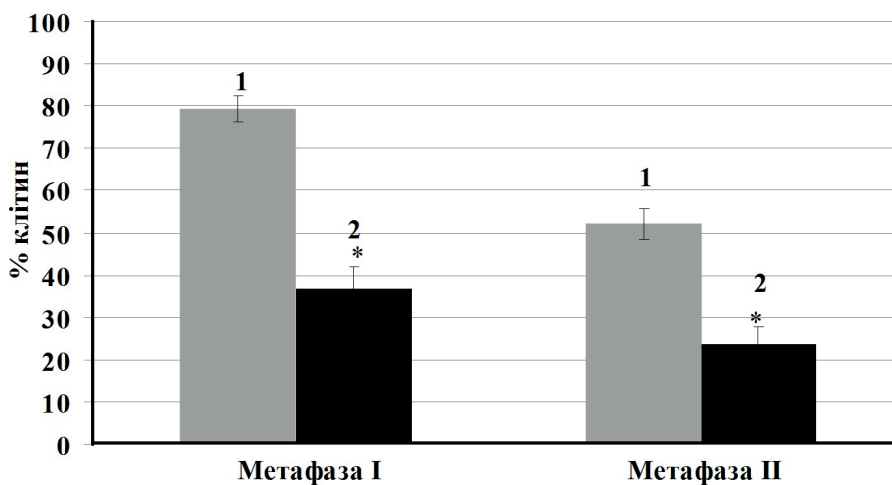


Рис.1. Мейотичне дозрівання (метафази I та II) ооцитів в умовах системного аутоімунного ушкодження: 1-контроль, 2-системне аутоімунне ушкодження. * $P < 0,001$ щодо контролю

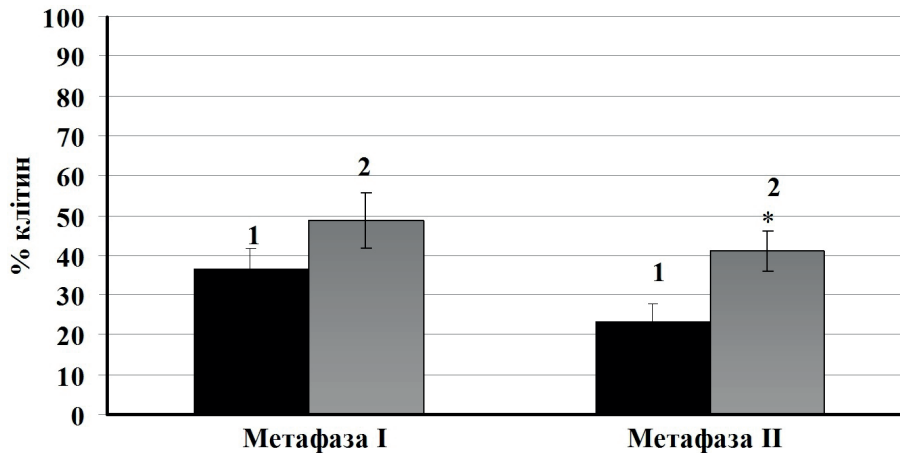


Рис. 2. Мейотичне дозрівання (метафази I та II) ооцитів в умовах системного аутоімунного ушкодження та застосування ресвератролу: 1-системне аутоімунне ушкодження, 2-системне аутоімунне ушкодження і вплив ресвератролу. *P<0,05 щодо значень у групі із системним аутоімунним ушкодженням

цитів тощо), значна роль належить апоптозу, тому втручання в цей процес може призвести до негативних наслідків. Важливо вивчити загибель фолікулярних клітин яєчника в нормі й за патологічних умов, особливо пов'язаних з аутоімунними розладами, оскільки як недостатній, так і надмірний рівень апоптозу клітин може стати патологічним чинником.

Показано, що пригнічення функції яєчників супроводжувалося суттєвими змінами життєздатності та загибеллю фолікулярних

клітин (рис.3.). За умов моделювання системного аутоімунного ушкодження зменшується кількість живих фолікулярних клітин до $39,2 \pm 0,8\%$ щодо $79,3 \pm 0,4\%$ у контрольній групі (P<0,001). Кількість клітин із морфологічними ознаками апоптозу збільшилася до $38,5 \pm 2,0\%$ (P<0,001) відносно $13,3 \pm 0,6\%$ у контролі. Також підвищився рівень некрозу фолікулярних клітин до $22,3 \pm 1,6\%$ у дослідній групі тварин порівняно із $7,4 \pm 0,8\%$ у контролі (P<0,001).

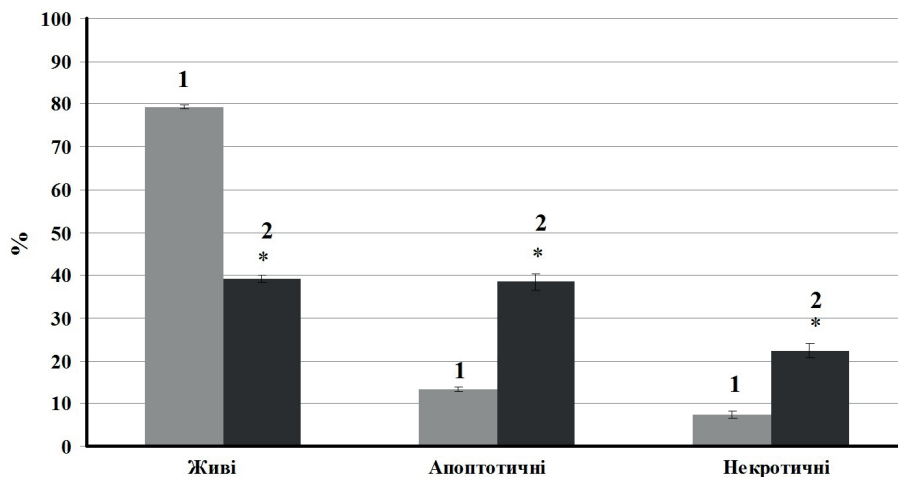


Рис.3. Життєздатність фолікулярних клітин та шляхи їх загибелі в умовах системного аутоімунного ушкодження: 1-контроль, 2-системне аутоімунне ушкодження. *P<0,001 щодо контролю

Культивування клітин із активатором сиртуїнів ресвератролом показало підвищення життєздатності фолікулярних клітин (рис.4.). Так, відсоток живих клітин за умов моделювання системного аутоімунного ушкодження становив $39,2 \pm 0,8\%$, а при культивуванні з ресвератролом – $49,7 \pm 0,8\%$ ($P < 0,05$). Число клітин із морфологічними ознаками апоптозу у II групи тварин становило $38,5 \pm 2,0\%$, а для III групи – $32,1 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$). Некроз – $22,3 \pm 1,6\%$ та $18,2 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$) для II та III групи відповідно.

Таким чином, в умовах системного аутоімунного ушкодження пригнічуються параметри життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, а саме: зменшується частка живих клітин, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу зростає. Застосування ресвератролу в цих умовах призводить до зниження загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів - збільшується кількість живих клітин, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу зменшується. Це дає змогу вважати, що ресвератрол здатний підвищувати якість ооцитів при наявності в організмі системного аутоімунного ушкодження.

Нині загальноприйнятою є імунозапальна теорія патогенезу гломерулонефриту. Також системне запалення розглядають як чинник

аутоімунізації і репродуктивних розладів у жінок [2, 9-12]. Експресія сиртуїну 1 пов'язана зі зміною конфігурації хроматину в ооцитах миші, що розчинили зародковий пухирець та утворили перше полярне тільце [13], а також із окисним стресом і репродуктивним старінням [7, 14]. Показано, що він через зміну внутрішньоклітинної локалізації, активуючи перегрупування хроматину під час стадії метафази I та модулюючи антиоксидантну ферментну відповідь, задіяний у запуск адаптивної реакції на окисний стрес в ооцитах мишей [7]. Сиртуїни 1 та 3 виявляють захисні ефекти, пов'язані з загальною стійкістю до стресів, стабілізуючи електронно-транспортний ланцюг мітохондрій та знижуючи окисний стрес через вплив на коактиватор γ -рецептора-активатора проліферації пероксидом 1 α (PGC-1 α) та збільшення інтенсивності аутофагії [15, 16]. Отже, вивчення ролі сиртуїнів у мейотичному дозріванні ооцитів є актуальним та перспективним. Це сприятиме позитивним результатам при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій підвищенням якості ооцитів і збільшенням потенціалу до розвитку ранніх ембріонів. За даними літератури, дія ресвератролу реалізується завдяки антизапальному ефекту, який пов'язаний з модуляцією експресії деяких

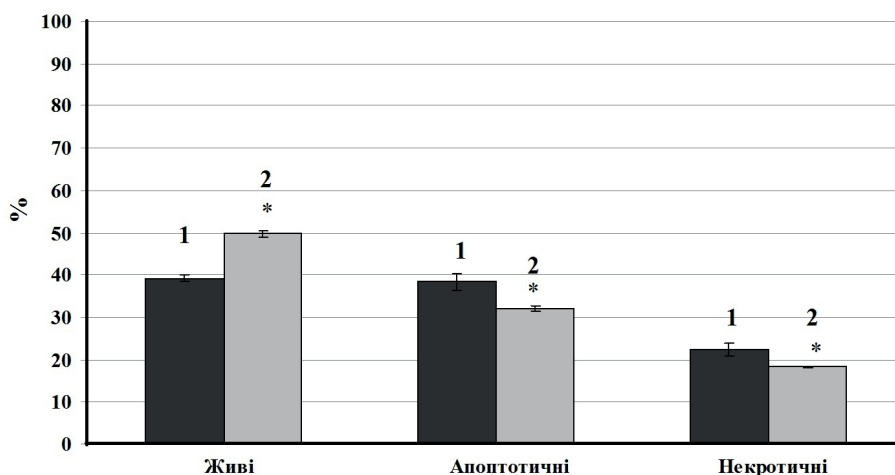


Рис.4. Життєздатність фолікулярних клітин та шляхи їх загибелі в умовах системного аутоімунного ушкодження та застосування ресвератролу: 1-системне аутоімунне ушкодження, 2-системне аутоімунне ушкодження і вплив ресвератролу. * $P < 0,05$ щодо значень у групі із системним аутоімунним ушкодженням

мікроРНК, активацією апуринової/апіримідинової ендонуклеази 1, що сприяє відновленню основ видаленням окисної ДНК та редоксактивованих транскрипційних факторів [17, 18].

Тому ми вважаємо, що дослідження впливу активатора сиртуїнів на функціональний стан ооцитів і клітин їх фолікулярного оточення при моделюванні системного аутоімунного uszkodження за допомогою імунізації мишей лінії СВА антигеном нирки є перспективним у пошуках стратегій, спрямованих на запобігання окисного uszkodження яєчників.

ВИСНОВОК

Системне аутоімунне uszkodження у мишей (моделювання гломерулонефриту) спричиняє зменшення кількості живих фолікулярних клітин та збільшення кількості апоптозу цих клітин, що є вагомою причиною порушення мейотичного дозрівання ооцитів. Використання активатора сиртуїнів ресвератролу за цих умов призводить до підвищення відсотка живих фолікулярних клітин та зниження показників їх апоптотичної та некротичної загибелі, позитивно впливає на успішне проходження ооцитами мейотичного дозрівання. А це дає змогу обґрунтовано вважати, що ресвератрол здатний покращувати якість ооцитів при аутоімунному гломерулонефриті.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

М.С. Ступчук, Р.І. Янчій, Т.Ю. Вознесенская

РОЛЬ СИРТУИНОВ В ИЗМЕНЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ООЦИТОВ И КЛЕТОК ИХ Фолликулярного окружения в условиях системного аутоиммунного повреждения у мышей

Изучали влияние активатора сиртуинов (ресвератрол) на функциональное состояние ооцитов и клеток их фолли-

кулярного окружения при моделировании экспериментального системного аутоиммунного повреждения путем иммунизации мышей линии СВА антигеном почки. Установлено существенное повреждение яичников мышей, достоверное уменьшение количества выделенных зрелых фолликулов и увеличение количества ооцитов с атипичной морфологией. Показано, что в экспериментальных условиях при культивировании значительно уменьшался процент ооцитов, которые растворяли зародышевый пузырек и формировали первые полярное тельце. Угнетение функции яичников сопровождалось существенными изменениями жизнеспособности клеток фолликулярного окружения ооцитов. При культивировании ооцитов в среде с ресвератролом в концентрации 20 мкмоль/л установлено увеличение на 12,2% количества клеток, которые растворяли зародышевый пузырек, относительно значений в группе без влияния ресвератрола, а ооцитов, сформировавших первое полярное тельце – на 17,4%. Отмечали также увеличение количества живых фолликулярных клеток на 10,5% и уменьшение таких клеток с морфологическими признаками апоптоза на 6,4% и некротических- на 4,1%, в сравнении с культивированием без ресвератрола. Ключевые слова: мейотическое созревания ооцитов; апоптоз; некроз; ресвератрол; системное аутоиммунное повреждение.

M.S. Stupchuk, R.I. Yanchiy, T.Y. Voznesenska

ROLE OF SIRTUINS IN CHANGE ON THE FUNCTIONAL STATUS OF OOCYTES AND CUMULUS CELLS OF FEMALE MICE UNDER CONDITIONS OF THE SYSTEMIC IMMUNE INJURY

The effect of sirtuins activator (resveratrol) on the functional state of oocytes (meiotic maturation) and cumulus cells (apoptosis and necrosis) was assessed using the model of systemic autoimmune damage created by immunizing the CBA line mice with kidney antigen suspension. Our study revealed a significant ovarian damage in mice under the conditions of experimental model. A significant decrease of the number of mature follicles isolated from the ovaries was observed and an increase (compared with control) of the number of oocytes with atypical morphology (unevenly granulated cytoplasm, signs of fragmentation of the cytoplasm) was noted. It was shown that, under experimental conditions during cultivation, the percentage of cells that dissolved germinal vesicle and capable to form first polar body significantly decreased. We have shown that inhibition of ovarian function was accompanied by a significant changes in viability and loss of cumulus cells. After the cultivation of oocytes in a medium containing the activator of sirtuins – resveratrol (20 μM), a significant increase of the percentage of oocytes that dissolved germinal vesicle and formed the first polar body was detected, as well as the increase of the number of viable cells and the decrease of the number of cells with morphological signs of apoptosis and necrosis.

Key words: meiotic maturation of oocytes; apoptosis; necrosis; resveratrol; systemic autoimmune damage.

O.O. Bohomolets Institute of Physiology NASU, Kyiv.

REFERENCES

1. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun.* 2012; 38(2-3): 266-74.
2. Cervera R, Balasch J. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010; 39(3): 148-52.
3. Szlendak-Sauer K, Jakubik D, Kunicki M, Skórska J, Smolarczyk R. Autoimmune polyglandular syndrome type 3 (APS-3) among patients with premature ovarian insufficiency (POI). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 203: 61-5.
4. Daan N, Hoek A, Corpeleijn E, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, Fauser BCJM et al. Reproductive characteristics of women diagnosed with premature ovarian insufficiency. *Reprod Biomed Online.* 2016; 32: 225-32.
5. Duhig K, Chappell L, Shennan AH. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med.* 2016; 9(3): 113-16.
6. Stupchuk MS, Voznesenska TYu. Biological effects and properties of eukaryotic sirtuins. *Fiziol Zh.* 2017; 4: 105-13. [Ukrainian].
7. Di Emidio G, Falone S, Vitti M, D'Alessandro AM, Vento M, Di Pietro C et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Hum Reprod.* 2014; 29(9): 2006-17.
8. Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, and Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet.* 2017; 91(2): 183-98.
9. Mc Dade T, Thomas W., Alexander V. Georgiev, and Christopher W. Kuzawa. Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. *Evol Med Public Health.* 2016; 1: 1-16.
10. Kwak-Kim J, Kim JW, Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am J Reprod Immunol.* 2014; 72(2): 129-40.
11. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34(4): 425-30.
12. Gilbert S, Weiner D. National kidney foundation's primer on kidney diseases. Elsevier. 2014; 592: 4557-617.
13. Manosalva I, Gonzalez A. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 2010; 74(9): 1539-47.
14. Lee D, Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *J Biol Chem.* 2013; 288(42): 30515-26.
15. Voznesenska TYu, Stupchuk MS, Kaleinikova ON, Blashkiv TV. Sirt1 as a key cell regulator of metabolism and oxidative stress. *Bull Probl Biol and Med.* 2018; 1(142): 20-5. [Ukrainian].
16. Koo JH, Cho JY. treadmill exercise attenuates α -synuclein levels by promoting mitochondrial function and autophagy possibly via SIRT1 in the chronic MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2017; 32(3): 473-86.
17. de Queiroz KB, Dos Santos Fontes Pereira T, Araújo MSS, Gomez RS, Coimbra RS. Resveratrol acts anti-inflammatory and neuroprotective in an infant rat model of pneumococcal meningitis by modulating the hippocampal miRNome. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(12): 8869-84.
18. Jia JY, Tan ZG, Liu M, Jiang YG. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) contributes to resveratrol induced neuroprotection against oxygen glucose deprivation and re oxygenation injury in HT22 cells: Involvement in reducing oxidative DNA damage. *Mol Med Rep.* 2017; 16(6): 9786-94.

*Матеріал надійшов
до редакції 29.11.2018*