

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

Шляхи загибелі фолікулярних клітин яєчника у мишей при порушенні оогенезу імунного походження

При двох видах імунного пошкодження яєчників у мишей (ксеногенними антиоваріальними антитілами та імунізацією аллогенним яєчником) встановлено порушення мейотического созрівання ооцитів в культурі. Порушення оогенеза супроводжалося гибелью фолікулярних кліток переважно по апоптотическому пути, однак при імунізації аллогенним яєчником активіровався і некротический путь их гибелі.

ВСТУП

Відомо, що аутоімунний компонент наявний при багатьох порушеннях функцій яєчника у жінок: неспецифічних запальних ураженнях яєчника [9], розвитку його передчасної недостатності [12], ушкодженні тканини яєчника після повторних пункцій фолікулів з метою екстракорпорального запліднення [6, 7]. Деякі форми безпліддя пов'язують з аутоімунними процесами [11]. При цих видах патології в сироватці крові жінок збільшується кількість антитіл до різних антигенів яєчника [4, 8, 11]. Показано, що при експериментальному імунному ураженні яєчників у мишей за допомогою ксеногенних антиоваріальних антитіл порушується мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro* [1, 2]. Розвиток ооцитів в яєчнику відбувається в тісному зв'язку з клітинами фолікулярного мікрооточення (гранулярними і кумулюсними). Показано, що надходження речовин, необхідних для метаболічних процесів у ооциті, є вирішальним для його росту та розвитку [3, 5, 10]. Наші попередні дані показали, що для розвитку ооцитів мишей у культурі необхідна наявність фолікулярних клітин, які секретують деякі термостабільні фактори, що паракринно

впливають на індукцію відновлення мейозу ооцитами [2].

Метою нашої роботи було вивчити мейотичне дозрівання ооцитів у культурі та шляхи загибелі фолікулярних клітин яєчника при двох видах експериментальної імунної патології у мишей.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на статевозрілих самицях мишей лінії СВА масою 18–20 г.

Імунну патологію яєчників викликали введенням ксеногенних антиоваріальних антитіл – I серія й імунізацією мишей аллогенним яєчником – II серія.

У I серії антитіла (γ -глобулінова фракція антиоваріальної цитотоксичної сироватки, що була отримана за допомогою імунізації кролів водно-сольовим екстрактом яєчника мишей лінії СВА), вводили мишам внутрішньовенно, щоденно протягом 3 діб, у дозі 0,2 мг білка на тварину. Через 24 год після останньої ін'єкції мишей наркотизували нембуталом і вилучали яєчники для подальшого дослідження.

У II серії мишей імунізували алогенним антигеном (водно-сольовим екстрактом яєчника безпородних мишей) за наступною

схемою: перше введення антигена було підшкірним у дозі 2 мг білка на мишу в повному ад'юванті Фрейда, надалі використовували 0,5; 0,75; 1,0 та 1,4 мг білка на мишу внутрішньовенно через дві доби на третю. Через 6 діб після останнього введення антигена тварин наркотизували нембуталом і вилучали яєчники для подальшого дослідження.

З яєчників усіх досліджених мишей стерильно виділяли зрілі фолікули, визначали їх кількість. З них виділяли кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси (КОКК) і досліджували *in vitro* мейотичне дозрівання ооцитів. Для цього КОКК культивували протягом 20 год у культуральному середовищі DME при 37°C. Після 4 год культивування підраховували ооцити, що перебували на стадії метафази I – розчинення зародкового пухирця, а після 20 год – на стадії метафази II – формування першого полярного тільця (рис. 1), а також ооцити з атипичною морфологією.

Для оцінки живих, апоптотичних і некротичних фолікулярних клітин використовували метод прижиттєвого подвійного забарвлення флюоресцентними барвниками Хехст 33422 та пропідіум йодид. Останній проникає тільки у клітини з ушкодженими мембранами та забарвлює їх ядра в

оранжевий колір. Барвник Хехст 33342 проникає і через неушкоджені мембрани та забарвлює ядра живих клітин в синьо-зелений колір. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні риси ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: периферичне розташування хроматину, його конденсацію, фрагментацію ядер, а також розпад клітин на апоптотичні тільця (рис. 2). Забарвлення проводили в забуференому фосфатами фізіологічному розчині з барвниками в кінцевій концентрації 10 мкмоль/л протягом 10 хв. Після відмивання клітини ресуспендували, фіксували 5%-м формаліном і робили мазки. Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2. Визначали відсоток живих, апоптотичних і некротичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин.

Для оцінки вірогідності використовували критерій *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імунне ушкодження яєчників за обома способами (I і II серії) призводило до зменшення кількості зрілих фолікулів (великих фолікулів з яйцеклітиною з вираженою прозорою оболонкою, декількома

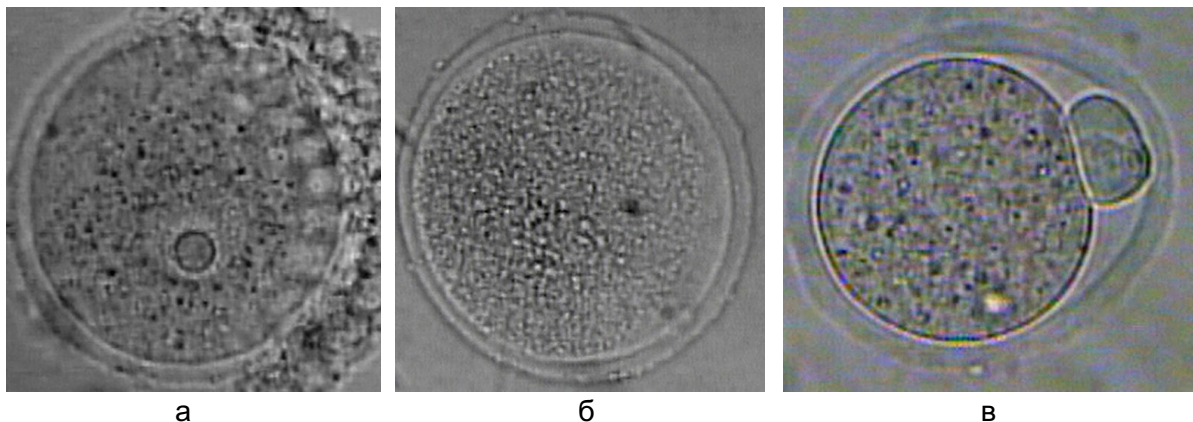


Рис. 1. Ооцити на різних стадіях мейотичного дозрівання: а – ооцит з зародковим пухирцем, б – стадія розчинення зародкового пухирця (метафаза I) через 4 год культивування, в – стадія формування першого полярного тільця (метафаза II) через 20 год культивування



Рис. 2. Фолікулярні клітини, забарвлені ядерними флюоресцентними барвниками: 1 – ядро інтактної клітини, 2 – морфологічні прояви апоптотичної загибелі – конденсація хроматину та фрагментація ядер

шарами фолікулярних клітин), а також до порушення мейотичного дозрівання ооцитів: спостерігалось зменшення відсотка клітин із розчиненим зародковим пухирцем (метафаза I) та клітин із сформованим першим полярним тільцем (метафаза II), (таблиця). Збільшувалася кількість ооцитів з атипичною морфологією – нерівномірно гранульованою цитоплазмою, ознаками фрагментації цитоплазми.

Пригнічення дозрівання ооцитів супроводжувалося суттєвими змінами життєздатності фолікулярних клітин (рис. 3).

Імунне ушкодження яєчників за обома способами викликало значне зменшення кількості живих клітин і суттєве збільшення їх загибелі за апоптотичним шляхом. При введенні ксеногенних антитіл (I серія) апоптоз клітин був виражений більшою мірою, ніж при імунізації мишей алогенним яєчником ($P < 0,01$). Водночас саме в умовах імунізації (II серія) збільшувалася кількість клітин, які гинули за некротичним шляхом і коефіцієнт апоптоз/некроз виявився значно вищим при введенні ксеногенних антитіл. Ці відмінності в шляхах

Показники стану яєчників мишей за умов моделювання їх аутоімунного ушкодження ($M \pm m$)

Схема дослідю	Кількість фолікулів, виділених з яєчника	Кількість ооцитів, що відновили мейоз, %	Кількість ооцитів, що сформували полярне тільце, %
Контроль	16,0±0,8	72,0±1,7	52,9±1,1
Введення антитіл	7,2±0,4**	48,7±5,5*	30,7±2,8**
Імунізація	7,6±0,3**	48,7±3,7**	29,8±1,6**

* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ відносно контролю.

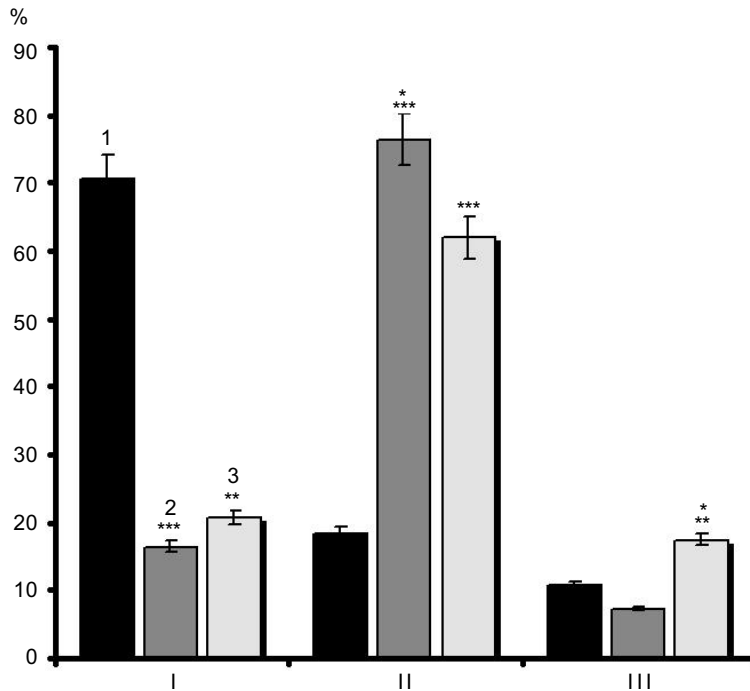


Рис. 3. Зміни кількості живих (I), апоптотичних (II) та некротичних (III) фолікулярних клітин яєчника мишей при дії ксеногенних антиоваріальних антитіл і в умовах імунізації антигеном алогенного яєчника: 1 – контроль, 2 – антитіла, 3 – імунізація. За віссю ординат – відсоток від загальної кількості клітин. * $P < 0,01$ між двома моделями; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ відносно контролю

загибелі фолікулярних клітин при досліджених нами видах імунного ушкодження яєчника свідчать про те, що причиною ураження яєчника в II серії досліджень можуть бути не лише антитіла, що утворюються при імунізації, а й клітинні імунні механізми, які при введенні ксеногенних антитіл відсутні, а також про те, що процес імунного ушкодження при імунізації більш тривалий і супроводжується розвитком запальних реакцій і хронізацією ураження.

Одержані результати показали, що порушення мейотичного дозрівання ооцитів при імунній патології супроводжується загибеллю фолікулярних клітин, яка відбувається переважно за апоптотичним шляхом. За цих умов, як і при інших видах патології, саме загибель клітин мікрооточення ооцита можна вважати домінуючим фактором порушення його дозрівання,

враховуючи функції цих клітин у регуляції метаболічних процесів в ооциті. Водночас існує і зворотний вплив ооцита на фолікулярні клітини. Як показали наші дослідження *in vitro* [1, 2] для запуску продукції кумулюсними клітинами мейоз-активуючих чинників необхідна наявність ооцита.

Таким чином, імунне ураження яєчників у мишей за двома шляхами: ксеногенними антиоваріальними антитілами і імунізацією тканиною алогенного яєчника – призводило до порушення мейотичного дозрівання ооцитів і зменшення кількості живих фолікулярних клітин. Загибель фолікулярних клітин відбувалася переважно за апоптотичним шляхом, однак в умовах імунізації активувався і некротичний шлях.

Робота була підтримана цільовою комплексною програмою наукових досліджень НАН України «Новітні медико-біологічні проблеми та оточуюче середовище людини».

**T.Yu. Voznesenskaya, N.V. Makogon,
T.M. Bryzgina, V.S. Sukhina, N.G. Grushka,
I.N. Alexeyeva**

THE PATHS OF FOLLICULAR CELL DAMAGE IN MICE OVARIES UNDER THE IMMUNE IMPAIRMENT OF OOGENESIS

An impairment of the meiotic maturation of the oocytes has been shown *in vitro* for 2 types of immune damage of the ovaries in mice induced by xenogenic antiovarial antibodies and immunization with allogenic ovaria. Impairment of the oogenesis was followed by the follicular cell death, primarily by the apoptotic way, but under the immunization with allogenic ovary a necrotic way of their death was also activated.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Блашків Т.В. Вознесенська Т.Ю. Регуляція оогенезу і антиоваріальні антитіла. – К., 2002. – 112 с.
2. Вознесенська Т.Ю. Роль кумулюсних клітин та іонів кальцію в мейотичному дозріванні ооцитів мишей в нормі та при дії антиоваріальних антитіл: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2002. – 19 с.
3. Armstrong D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence // *Theriogenology*. – 2001. – **1**, №55(6). – P. 1303–1322.
4. Barbarino-Monnier P., Gobert B., Guillet-Rosso F. et al. Antiovary antibodies repeated attempts and outcome of in vitro fertilization // *Fertil Steril*. – 1991. – №56(5). – P. 928–932.
5. Cortvrindt R, Smits J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species // *Reprod. Domest. Anim.* – 2001. – №36(1). – P. 3–9.
6. Horejsi J., Martinek J., Novakova D. et al. Autoimmune antiovarian antibodies and their impact on the success of an IVF/ET program // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2000. – **900**. – P. 351–356.
7. Hovav Y., Almagor M., Benbenishti D. et al. Immunity to zona pellucida in women with low response to ovarian stimulation, in unexplained infertility and after multiple IVF attempts // *Hum. Reprod.* – 1994. – **9**(4). – P.643–645.
8. Kalantaridou S.N., Nelson L.M. Premature ovarian failure is not premature menopause // *Ann N Y Acad Sci.* – 2000. – **900**. – P. 393–402.
9. Niauru D.A. Ovarian insufficiency in chronic nonspecific salpingo-oophoritis // *Fiziol. Cheloveka*. – 1995. – **21**(3). – P. 166–169.
10. Picton H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle // *Theriogenology*. – 2001. – **1**, №55(6). – P. 1193–1210.
11. Shivers C.A., Dunbar B.S. Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause for infertility in women // *Science*. – 1977. – **197**. – P.1082–1084.
12. Wheatcroft N.J., Toogood A.A., Li T.C. et al. Detection of antibodies to ovarian antigens in women with premature ovarian failure // *Clin. Exp. Immunol.* – 1994. – **96** (1). – P. 122–128

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 09.02.2006*