

СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МАСТОЦИТОВ И КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

Валикова О.В.^{1,2,3}, Здор В.В.^{1,4}, Тихонов Я.Н.¹, Борода А.В.⁵,
Колбин К.Г.⁶

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

² ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2, г. Владивосток, Россия

³ Клиника «Пластэк хирургия», г. Владивосток, Россия

⁴ Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

⁵ ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

⁶ Клиника репродукции и генетики “Next Generation Clinic”, г. Владивосток, Россия

Резюме. Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) характеризуется нарушением менструального цикла, гиперандрогенией, морфологией поликистозных яичников. Распространенность СПКЯ у женщин репродуктивного возраста достаточно высокая, составляет от 6-9% до 19,9%. По современной номенклатуре аллергических заболеваний и реакций гиперчувствительности, к VI типу относится СПКЯ. Гены, связанные с врожденными иммунными реакциями, экспрессируются в кумулюсных клетках, соответственно кумулюсные клетки приобретают функции иммунных клеток в преовуляторном периоде и во время овуляции. Мастоциты вовлечены в патологию «женское бесплодие» при имплантации, беременности, потерях беременности. Количество мастоцитов в яичниках у пациенток с СПКЯ значительно ниже, в сравнении с яичниками пациенток без СПКЯ. При отсутствии у овулирующего ооцита кумулюсного оофорного комплекса, он остается неоплодотворенным. Целью исследования является изучение функциональных возможностей кумулюсных клеток яичника при СПКЯ по их цитокинпродуцирующей функции, в том числе при сокультивировании кумулюсных клеток с мастоцитами для выявления их взаимного влияния и роли в иммунопатогенезе синдрома поликистозных яичников. Использовалась постоянная линия тучных клеток человека НМС-1 (Human mast cell, АТСС, США) и первичная культура кумулюсных клеток. Ежедневное наблюдение за клетками осуществляли с помощью инвертированного микроскопа. Состояние кумулюсных клеток и мастоцитов определяли с помощью флуоресцентных красителей с последующей проточной цитометрией перед посадкой клеток и через 7 суток их сокультивирования. Исследовались уровни IL-6, IL-10,

Адрес для переписки:

Валикова Ольга Владимировна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690012, Россия, г. Владивосток,
ул. Фастовская, 14 кв. 184.
Тел.: 8 (902) 521-77-72.
E-mail: renalex.99@mail.ru

Address for correspondence:

Olga V. Valikova
Pacific State Medical University
14 Fastovskaya St, Apt 184.
Vladivostok
690012 Russian Federation
Phone: +7 (902) 521-77-72.
E-mail: renalex.99@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Валикова, В.В. Здор, Я.Н. Тихонов, А.В. Борода,
К.Г. Колбин «Совместное культивирование
мастоцитов и кумулюсных клеток при синдроме
поликистозных яичников» // Российский
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 483-492.
doi: 10.46235/1028-7221-16802-CCO

© Валикова О.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Valikova, V.V. Zdor, Ya.N. Tikhonov, A.V. Boroda,
K.G. Kolbin “Co-cultivation of mastocytes and cumulus cells in
polycystic ovary syndrome”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 3,
pp. 483-492.
doi: 10.46235/1028-7221-16802-CCO

© Valikova O.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16802-CCO

IFN γ на 1-е, 3-и, 7-е сутки эксперимента. Выявлено, что как в монокультуре, так и при совместном культивировании клеток продолжается синтез цитокинов IL-6, IL-10, IFN γ , но в разной степени выраженности и в зависимости от наличия СПКЯ. В постоянной линии тучных клеток происходит планомерное увеличение IL-6, IL-10, IFN γ на 1-е, 3-и, 7-е сутки культивирования. В первые сутки эксперимента баланс Th1/ Th2 цитокинов при СПКЯ двукратно превышал аналогичный показатель у здоровых женщин, а в динамике соотношение нарастало и на 7-е сутки эксперимента достигло 3,83 раза выше показателя соотношения Th1/ Th2 цитокинов в группе контроля. Гиперпродукция IFN γ мастоцитами была наиболее значима при сокультивировании их с кумулюсными клетками, так как в монокультуре тучные клетки синтезировали избыточно цитокин только двукратно от исходных значений IFN γ , а среда с монокультурой кумулюсные клетки при СПКЯ практически не содержала IFN γ к 7-м суткам эксперимента. Исследуемые цитокины являются регуляторами функции кумулюсных клеток яичника и факторами, повышающими компетентность ооцита, свидетельствующие о необходимости их коррекции, что позволит реально влиять на звенья патогенеза в СПКЯ в дальнейшем.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников, кумулюсные клетки, мастоциты, цитокины, культивирование, клеточные культуры

CO-CULTIVATION OF MASTOCYTES AND CUMULUS CELLS IN POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Valikova O.V.^{a, b, c}, Zdor V.V.^{a, d}, Tikhonov Ya.N.^a, Boroda A.V.^e, Kolbin K.G.^f

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Regional Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russian Federation

^c Clinic "Plastic Surgery", Vladivostok, Russian Federation

^d Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

^e A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

^f Clinic for Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to study the cytokine-producing function of cumulus cells of the ovaries in PCOS during co-cultivation of cumulus cells with mast cells to identify their mutual influence in the immunopathogenesis of PCOS.

The study was approved by the Interdisciplinary Ethics Committee of the FSBEI of HE of the Ministry of Health of the Russian Federation. A permanent human mast cell line HMC-1 (Human mast cell, ATCC, USA) and a primary culture of cumulus cells were used. The condition of cumulus cells and mastocytes was determined using fluorescent dyes followed by flow cytometry before co-cultivation and after 7 days co-cultivation. The levels of IL-6, IL-10, and IFN γ were studied on days 1, 3, and 7 of the experiment.

In monoculture and during co-culture of cells, the synthesis of cytokines IL-6, IL-10, and IFN γ continues, but to varying degrees of severity. In the permanent mast cell line, an increase in IL-6, IL-10, and IFN γ is observed on the 1st, 3rd, and 7th days of cultivation. On the first day, cytokine levels of donor cumulus cells and mastocytes did not differ significantly ($p > 0.05$). In the culture of donor cumulus cells, the synthesis of IL-6, IL-10, and IFN γ progressively increases by the 7th day of the experiment ($p < 0.05$). On the first day of the experiment, the balance of Th1/Th2 cytokines in PCOS was twice as high as in healthy women. The ratio increased, and on the 7th day reached 3.83 times higher than the ratio of Th1/Th2 cytokines in the control group. Hyperproduction of IFN γ by mastocytes was most significant when they were co-cultured with cumulus cells, in monoculture mast cells synthesized excessively cytokine twice from the initial values of IFN γ , and the monoculture cumulus cells in PCOS it practically did not contain.

The studied cytokines are regulators of the function of ovarian cumulus cells and factors that increase the competence of the oocyte, indicating the need for their correction, which will allow a real influence on the links of pathogenesis in PCOS in the future.later on.

Keywords: polycystic ovary syndrome, cumulus cells, mastocytes, cytokines, cultivation, cell cultures

Введение

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) характеризуется нарушением менструального цикла, гиперандрогенией, морфологией поликистозных яичников [1, 3]. Диагноз СПКЯ основывается минимум на двух из трех вышеперечисленных признаках [3]. Распространенность СПКЯ у женщин репродуктивного возраста по данным Клинических рекомендаций «Современные подходы к лечению и диагностике синдрома поликистозных яичников в репродуктивном возрасте» 2022 года под редакцией Л.В. Адамян достаточно высокая, составляет от 6-9% до 19,9% [1]. Нарушение менструального цикла, бесплодие, гирсутизм – это симптомы, которые заставляют пациентку обратиться на прием, но это только малая часть изменений присущих СПКЯ, иммунологическая дисрегуляция при СПКЯ, затрагивает не только женскую репродуктивную систему, но и весь организм [13]. Гиперандрогения и инсулинорезистентность обуславливают дисфункцию иммунных клеток и влияют на дисбаланс цитокинов [13]. Согласно современной номенклатуре аллергических заболеваний и реакций гиперчувствительности, пересмотренной Европейской академией аллергии и клинической иммунологии [5], реакции гиперчувствительности расширены до девяти типов, VI тип, включает метаболически – индуцированную иммунную дисфункцию, к VI типу относится СПКЯ [5]. В 1988 г. Thibault С. и Levasseur М.С. изучали влияние гистамина на овуляцию [11], в норме во время фолликулогенеза происходят биохимические и цитологические изменения в стенке фолликула, распад апикальной части фолликула, созревание ооцита. В разрушении верхушки фолликула играет роль коллагеназа, гистамин, плазмин [11]. Годом позже Krishna А. и его коллеги выявили, что у человека тучные клетки распределены во всех частях яичника, гистамин принимает участие в регуляции проницаемости капилляров и кровотока в яичниках, под воздействием лютеинизирующего гормона [6]. Гены, связанные с врожденными иммунными реакциями и функциями иммунных клеток (фактор комплемента q1, CD14 и Toll-подобные рецепторы (TLR) 4, 8 и 9, медиаторы активации TLR, регуляторный фактор интерферона 3) экспрессируются в кумулюсных клетках, соответственно кумулюсные клетки приобретают функции иммунных клеток в преовуляторном периоде и во время овуляции [9, 10]. Выявлено, что интерлейкин-6 действует как мощный аутокринный регулятор функции кумулюсных клеток (КК) яичников, расширения кумулюсно-ооцитарного комплекса (КОК) и качества ооцитов [7]. Проведенные исследования доказывают, что МС вовлечены в патологию «женское бесплодие» при

имплантации, беременности, потерях беременности [2]. МС могут продуцировать эстрадиол и прогестерон [2]. Гистамин МС (тучных клеток) благоприятно влияет на имплантацию благодаря участию гистамина в ремоделировании тканей. Триптаза и химаза активируют матриксные металлопротеиназы 2-го типа (ММР2) и матриксные металлопротеиназы 9-го типа (ММР9), влияя на деградацию внеклеточного матрикса во время физиологического менструального цикла [2]. МС сосредотачиваются на внешней теке доминантного фолликула, в интерстициальной коре и мозговом веществе яичника больше триптазопозитивных МС, чем химазопозитивных [4], было выявлено, что количество МС в яичниках у пациенток с СПКЯ значительно ниже, в сравнении с яичниками пациенток без СПКЯ [4]. Обнаружены значимые количества триптазы в фолликулярной жидкости и семенной жидкости человека и МС – триптазо-положительных клетки в стенке фаллопиевых труб человека [14]. Во время естественного оплодотворения только сперматозоиды, которые пересекают КОК получают возможность достичь и проникнуть в зону пеллюцидов и оплодотворить ооцит. Если овулированный ооцит полностью лишен кумулюсного оофорного комплекса, он остается неоплодотворенным [12]. Выявлено, что триптаза напрямую взаимодействует со сперматозоидами человека во время их миграции по женской репродуктивной системе [14], эти открытия позволяют думать о взаимодействии кумулюсных клеток и сперматозоида, при помощи триптазы, т. е. продукта деградации МС. Изучение КК, находящихся в тесном контакте с ооцитом позволяет судить о качестве яйцеклетки и прогнозировать исход ее оплодотворения [12]. Роль клеток врожденного иммунитета является предметом активного исследования при аутоиммунной патологии эндокринной системы и при синдроме поликистозных яичников (СПКЯ).

Целью исследования является изучение функциональных возможностей кумулюсных клеток яичника при СПКЯ по их цитокинпродуцирующей функции, в том числе при сокультивировании КК с мастоцитами для выявления их взаимного влияния и роли в иммунопатогенезе синдрома поликистозных яичников. Необходимы дальнейшие исследования с использованием первичных культур кумулюсных клеток и МС для изучения их возможных межклеточных взаимодействий и влияния половых гормонов на активацию КК и МС в яичнике.

Материалы и методы

Исследование одобрено Междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Мин-

здрави России (протокол № 9 от 16.05.2022 г.). Использовалась постоянная линия тучных клеток человека НМС-1 (Human mast cell, АТСС, США) и первичная культура кумулюсных клеток. После подписания добровольного информированного согласия в исследовании, использовались кумулюсные клетки пациенток, отделенных от ооцита, не используемые в дальнейшей процедуре ИКСИ при ЭКО после проведения трансвагинальной пункции в условиях стерильной операционной в асептических условиях специализированной клиники. Механическое отделение КК от ооцита без нарушения его целостности делает возможным применение КК в исследованиях, что никак не нарушает права эмбриона. КК человека были получены от 12 здоровых доноров (средний возраст $28,6 \pm 5,3$ лет) и 10 пациенток СПКЯ (средний возраст $29,4 \pm 3,6$ лет), прошедших процедуру ЭКО-ИКСИ в клинике репродукции г. Владивостока. Для стимуляции яичников и созревания фолликула использовались стандартные протоколы вспомогательных репродуктивных технологий.

После получения кумулюсно-ооцитарных комплексов происходит механическое отделение КК от ооцита. Изолированные КК – в лаборатории клеточных технологий ННЦМБ ДВО РАН механически диссоциированы на отдельные клетки и посажены в 6-луночные планшеты для адгезивных культур (TPP, Швейцария). Кумулюсные и тучные клетки (МС, постоянная линия тучных клеток человека НМС-1 – Human mast cell, АТСС, США) сокультивировали в соотношении 2:1 при 37°C , 5% CO_2 и влажности 95%. В качестве среды использовали IMDM (модифицированную по Дульбекко среду Игла, Sigma-Aldrich; Дармштадт, Германия) с добавлением 20%-ной эмбриональной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США), смеси заменимых аминокислот MEM NEAA (Gibco, США), смеси незаменимых аминокислот MEM EAA (Sigma-Aldrich, США), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, США), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Смена среды производили каждые 3 суток. Состояние КК и МС определяли с помощью флуоресцентных красителей с последующей проточной цитометрией перед посадкой клеток и через 7 суток их сокультивирования. Клетки открепляли из лунок планшета с помощью смеси 0,05% трипсин – 0,02% EDTA осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 мин при RT. К осадкам клеток из индивидуальных лунок добавляли 100 мкл смеси красителей: 4',6-диамидино-2-фенилиндол (ДАПИ, Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 1 мкг/мл для окрашивания мертвых клеток, H2DCFDA (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл для окрашивания кле-

ток с функционально-активными митохондриями, TO-PRO-3™ (Thermo Scientific, США) в конечной концентрации 1 мкМ для окрашивания апоптотических клеток. Окрашивание производили в течение 10 мин при RT. После этого суспензии анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США), подключенном к компьютеру с лицензионным программным обеспечением CytExpert (v. 2.5, Beckman Coulter, США). Для анализа использовали не менее 10 тыс. событий. Открепление клеток смесью 0,05% трипсин – 0,02% EDTA (среда из лунок отбираем, ополаскиваем 2 мл DPBS (Sigma-Aldrich, США) без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , добавляли смесь трипсина по 700 мкл/лунку на 10 минут при $+37^\circ\text{C}$, суспендировали содержимое лунок, переносили в центрифужную пробирку, ополаскивали лунки 2 мл среды, переносили в центрифужную пробирку, центрифугировали 5 мин при 500 g, супернатант убирал, к осадку добавляли свежую среду. В использованной среде на 1-е, 3-и, 7-е сутки при помощи ИФА определялись показатели цитокинов (IL-6, IL-10, IFN γ). Ежедневное наблюдение за клетками осуществляли с помощью инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), оснащенного системой фазового контраста. Съемку проводили камерой AxioCam5 (Carl Zeiss, Германия) с помощью лицензионного программного обеспечения Zen 2, Blue Edition (Carl Zeiss, Германия). Для расчета использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни; при значении $p < 0,05$ отличия считались значимыми.

Результаты и обсуждение

Параметры изменения цитокинов в различные сутки эксперимента в постоянной линии МС (тучных клеток человека НМС-1) и адгезивной культуре кумулюсных клеток, а также во время совместного культивирования постоянной линии тучных клеток человека НМС-1 и адгезивной культуры кумулюсных клеток представлены на рисунках 1 и 2. Выявлено, что, как в монокультуре, так и при совместном культивировании клеток продолжается синтез цитокинов IL-6, IL-10, IFN γ , но в разной степени выраженности и в зависимости от наличия СПКЯ. В постоянной линии тучных клеток происходит планомерное увеличение IL-6, IL-10, IFN γ на 1-е, 3-и, 7-е сутки культивирования. На первые сутки показатели цитокинов КК доноров и МС значимо не отличаются ($p > 0,05$). В культуре КК доноров синтез IL-6, IL-10, IFN γ значимо и поступательно увеличивается к 7-м суткам эксперимента ($p < 0,05$).

В культуре КК при СПКЯ уровень IL-6 был изначально выше, в сравнении с контрольной группой и на 3-и, 7-е сутки так же, как и в кон-

троле, повышался, но динамика роста была значительно слабее и показатель цитокина был в 4 раза ниже контроля ($p < 0,05$). Что может свидетельствовать об истощении КК. При совместном культивировании МС и КК доноров происходит планомерное нарастание IL-6 к 7-м суткам эксперимента (рис. 2). При совместном культивировании КК и МС при СПКЯ происходит наоборот (рис. 1), значимое снижение показателя, что может прямо свидетельствовать о взаимном подавлении цитокинпродуцирующей функции клеток, так как подобного явления в монокультуре мастоцитов не наблюдалось. Значимое исходное повышение после гормональной подготовки к ЭКО уровня IL-6 в среде КК при СПКЯ и дальнейшее его более слабое, по сравнению с контролем, нарастание в динамике свидетельствует о возможно более слабой экспрессии генов IL-6SR на кумулюсных клетках при СПКЯ и прямую зависимость экспрессии от уровня половых гормонов. Более того, значимое снижение IL-6 в случае СПКЯ при сокультивировании КК и МС, может свидетельствовать о слабом восприятии КК активационных сигналов, вероятно, из-за слабой

экспрессии генов IL-6SR, и как следствие, активационное истощение КК [9], что требует дальнейших исследований. Сниженный синтез IL-6, как аутокринного регулятора функции кумулюсных клеток яичников и фактора, повышающего компетентность ооцитов [7], свидетельствует о необходимости его коррекции, что позволит реально влиять на звенья иммунопатогенеза СПКЯ в дальнейшем.

Уровень IFN γ в монокультуре КК при СПКЯ снижался, но при совместном культивировании с МС, как в группе контроля, так и при СПКЯ на 7-е сутки эксперимента увеличения достигло более, чем пятикратного в сравнении с первыми сутками ($p < 0,05$). Показатели на 1-е и 3-и сутки в культуре МС и при совместном культивировании МС и КК доноров и СПКЯ значимо не отличались ($p > 0,05$). В монокультуре КК группы контроля также произошло снижение показателя на 3-и сутки, но на 7-е сутки увеличение составило более чем в 10 раз. В первые сутки эксперимента баланс Th1/Th2 цитокинов при СПКЯ двукратно превышал аналогичный показатель у здоровых женщин, а в динамике соотношение

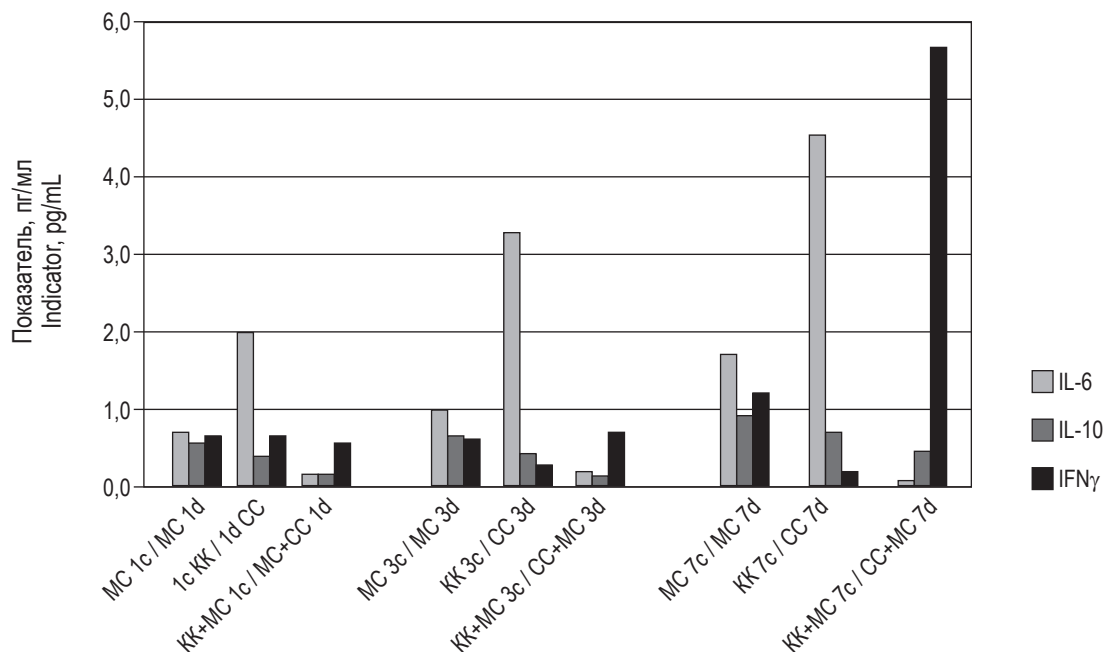


Рисунок 1. Уровень цитокинов при совместное культивирование постоянной линии тучных клеток человека HMC-1 и кумулюсных клеток пациенток с синдромом поликистозных яичников

Figure 1. Cytokine levels during co-cultivation of a permanent line of human mast cells HMC-1 and cumulus cells of patients with polycystic ovary syndrome

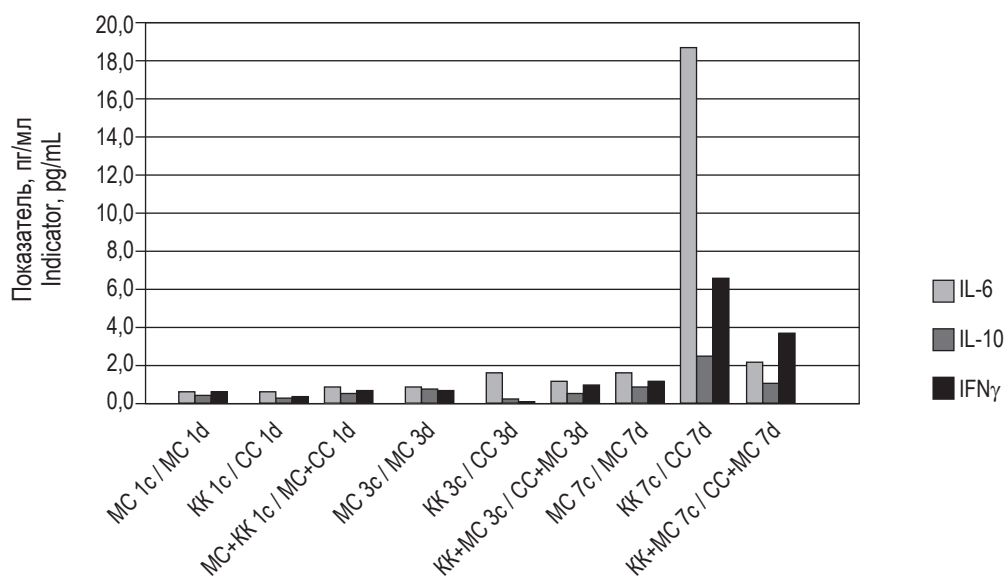


Рисунок 2. Уровень цитокинов при совместное культивирование постоянной линии тучных клеток человека HMC-1 и кумулюсных клеток здоровых доноров

Figure 2. Cytokine levels during co-cultivation of a permanent line of human mast cells HMC-1 and cumulus cells of healthy donors

нарастало и на 7-е сутки эксперимента достигло 3,83 раза выше показателя соотношения Th1/Th2 цитокинов в группе контроля.

Содержание IFN γ значимо нарастает при сокультивировании мастоцитов и кумулюсных клеток как в норме, так и при СПКЯ. Однако конечные значения при сокультивировании при СПКЯ достоверно превышают аналогичные показатели донорских клеток, и эти данные могут быть созвучны с данными о позитивном влиянии прогестерона на синтез IFN γ и негативном влиянии IFN γ на вынашивание беременности при СПКЯ [8]. Синтез интерферона- γ при сокультивировании КК и МС при СПКЯ происходит исключительно за счет его продукции тучными клетками, так как в монокультуре КК при СПКЯ синтез IFN γ значимо падает практически до следовых значений к 7-м суткам эксперимента, что свидетельствует о функциональном дефиците кумулюсных клеток при данной патологии.

Гиперпродукция IFN γ мастоцитами была наиболее значима (в 9,5 раз от исходной) при сокультивировании иммуноцитов с КК, так как в монокультуре тучные клетки синтезировали избыточно цитокин только двукратно от исходных значений IFN γ , а среда с монокультурой КК при СПКЯ практически не содержала IFN γ к 7-м суткам эксперимента.

IL-10, как известно, оказывает ингибирующее влияние на Th1 ответы и способствует толерант-

ности к аллотрансплантату и, следовательно, может улучшать выживаемость плода. Уровень IL-10 в нашей культуре КК доноров, при СПКЯ и в культуре МС повышался ($p < 0,05$), но на 7 сутки увеличение показатели в группе контроля было выше более, чем в 5 раз в сравнении с СПКЯ, и более чем в 3 раза в сравнении с МС ($p < 0,05$). При совместном культивировании показатель IL-10 снизился на 3-и сутки при СПКЯ, но затем на 7-е сутки увеличился в 2 раза в сравнении с 1-ми сутками, при культивировании КК доноров и МС происходило увеличение IL-10 ($p < 0,05$).

Продукция IL-10 в клеточных культурах и ее динамика были аналогичны динамике продукции IL-6 — нарастание в монокультурах в норме и при СПКЯ. Однако в случае патологии — КК синтезировали цитокин слабее. При сокультивировании КК и МС данная тенденция сохранялась в целом для IL-6 и IL-10, за исключением продукции интерферона- γ , что нарушало баланс IFN γ /IL-10 в сторону цитокинов Th1-типа, и это, в конечном счете, могло определять прогноз течения беременности при СПКЯ и ставить под угрозу вынашивание беременности по сравнению со здоровыми женщинами [13].

По результатам показателей проточной цитометрии, представленных на рисунке 3, показано состояние при совместном культивировании КК от здоровых доноров и МС, на рисунке 4 показа-

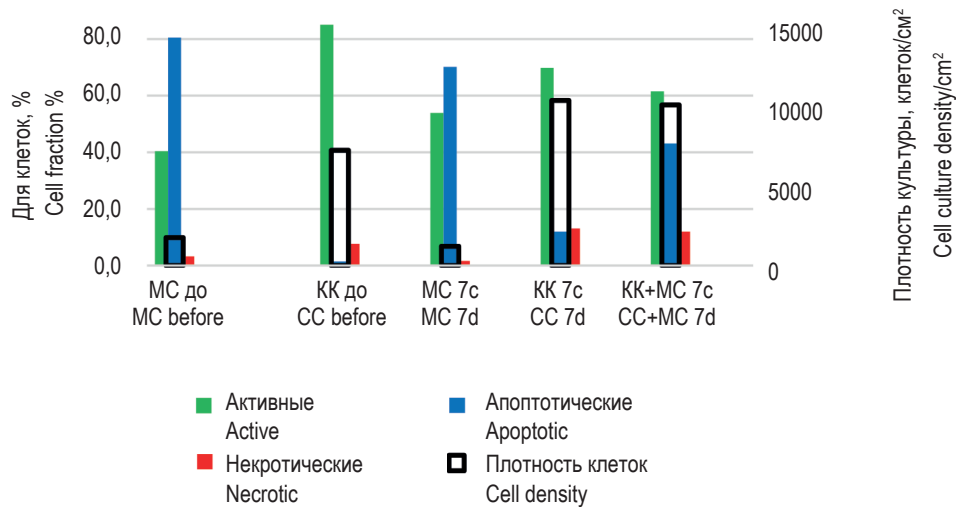


Рисунок 3. Показатели цитометрии при совместное культивирование постоянной линии тучных клеток человека НМС-1 и кумулюсных клеток здоровых доноров

Figure 3. Cytometry parameters in the co-cultivation of a permanent line of human mast cells HMC-1 and cumulus cells of healthy donors

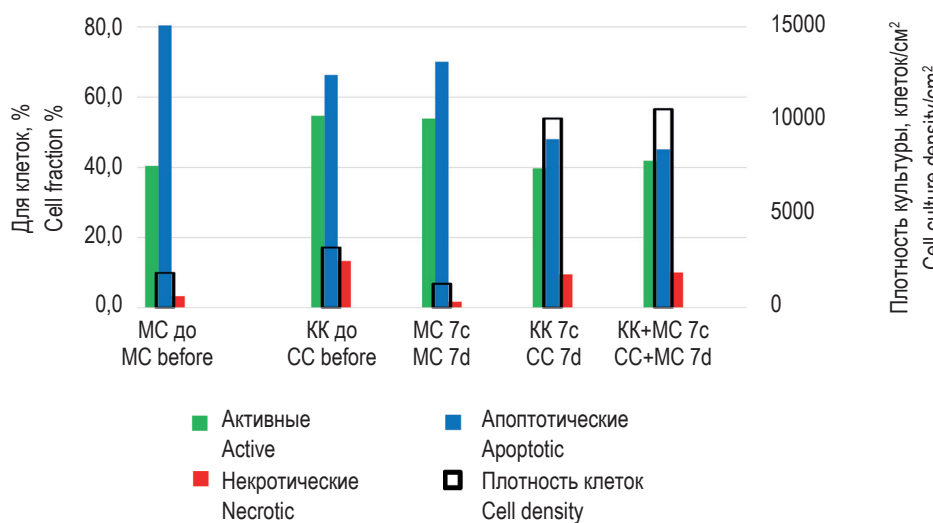


Рисунок 4. Показатели цитометрии при совместном культивирование постоянной линии тучных клеток человека НМС-1 и кумулюсных клеток пациенток с синдромом поликистозных яичников

Figure 4. Cytometry parameters in the joint cultivation of a permanent line of human mast cells HMC-1 and cumulus cells of patients with polycystic ovary syndrome

но состояние при совместном культивировании КК от пациенток с СПКЯ и МС.

Характеристики КК пациенток с СПКЯ и здоровых доноров отличались изначально со

значимым превышением как количества, так и функциональной активности у клеток здоровых лиц. У пациенток СПКЯ плотность клеток изначально составила 3024 клетки/см²; активных

клеток 54,7%, а на 7-е сутки плотность клеток увеличилась до 9516 клеток/см², но при этом процент активных клеток снизился до 39,7% (рис. 3). У здоровых доноров плотность клеток изначально составила 7187 клеток/см² и активных клеток было 86,9%, а на 7-е сутки плотность клеток увеличилась до 10285 клеток/см², но при этом активных клеток было 69,8% (рис. 4). При совместном культивировании КК и МС плотность клеток нарастала, но количество активных клеток на 7-е сутки было все равно выше у здоровых доноров, что подтверждает данные, полученные нами при исследовании продукции цитокинов клеточными культурами. В заключение, мы хотели отметить, что исследуемые нами цитокины являются регуляторами функции кумулюсных клеток яичника и факторами повышающими компетент-

ность ооцита свидетельствующие о необходимости их коррекции, что позволит реально влиять на звенья патогенеза в СПКЯ в дальнейшем.

Благодарности

Благодарность за техническую поддержку экспериментального исследования авторы статьи выражают Федеральному государственному бюджетному учреждению науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук сотрудникам лаборатории клеточных технологий; Грачевой Алине Максимовне, главному врачу клиники репродукции и генетики Next Generation Clinic, г. Владивосток; клинике «Пластэк хирургия», г. Владивосток.

Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Андреева Е.Н., Абсаратова Ю.С., Григорян О.Р., Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Сутурин Л.В., Филиппов О.С., Чернуха Г.Е., Шереметьева Е.В., Ярмолинская М.И. Синдром поликистозных яичников в репродуктивном возрасте (современные подходы к диагностике и лечению): Клинические рекомендации (протокол лечения) // Проблемы эндокринологии, 2022, Т. 68, № 2. С. 112-127. [Adamyany L.V., Andreeva E.N., Absatarova Y.S., Grigoryan O.R., Dedov I.I., Melnichenko G.A., Suturina L.V., Filippov O.S., Sheremetyeva E.V., Chernukha G.E., Yarmolinskaya M.I. Clinical guidelines "Polycystic Ovary Syndrome". *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2022, Vol. 68, no. 2, pp. 112-127. (In Russ.)]
2. Elieh Ali Komi D., Shafaghat F., Haidl G. Significance of mast cells in spermatogenesis, implantation, pregnancy, and abortion: Cross talk and molecular mechanisms. *Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 83, no. 5, e13228. doi: 10.1111/aji.13228.
3. Goodman N.F., Cobin R.H., Futterweit W., Glueck J.S., Legro R.S., Carmina E.; American Association of Clinical Endocrinologists (AACE); American College of Endocrinology (ACE); Androgen Excess and PCOS Society (AES). American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and PCOS Society Disease State Clinical Review: Guide to the Best Practices in the Evaluation and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome – Part 1. *Endocr. Pract.*, 2015, Vol. 21, no. 11, pp. 1291-1300.
4. Heider U., Pedal I., Spanel-Borowski K.. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil. Steril.*, 2001, Vol. 75, no. 6, pp. 1141-1147.
5. Jutel M., Agache I., Zemelka-Wiacek M., Akdis M., Chivato T., Del Giacco S., Gajdanowicz P., Gracia I.E., Klimek L., Lauerma A., Ollert M., O'Mahony L., Schwarze J., Shamji M.H., Skypala I., Palomares O., Pfaar O., Torres M.J., Bernstein J.A., Cruz A.A., Durham S.R., Galli S.J., Gómez R.M., Guttman-Yassky E., Haahtela T., Holgate S.T., Izuhara K., Kabashima K., Larenas-Linnemann D.E., von Mutius E., Nadeau K.C., Pawankar R., Platts-Mills T.A.E., Sicherer S.H., Park H.S., Vieths S., Wong G., Zhang L., Bilò M.B., Akdis C.A. Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: Adapted to modern needs: An EAACI position paper. *Allergy. Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 2023, Vol. 78, no. 11, pp. 2851-2874.
6. Krishna A., Beesley K., Terranova P.F. Histamine, mast cells and ovarian function. *Am. J. Endocrinol.*, 1989, Vol. 120, no. 3, pp. 363-371.
7. Liu Z., de Matos D.G., Fan H.Y., Shimada M., Palmer S., Richards J.S. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Am. J. Endocrinol.*, 2009, Vol. 150, no. 7, pp. 3360-3368.
8. Piccinni M.P. Role of T-cell cytokines in decidua and in cumulus oophorus during pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2007, Vol. 64, no. 3, pp. 144-148.
9. Richards J.S. Genetics of ovulation. *Semin Reprod. Med.*, 2007, Vol. 25, no. 4, pp. 235-242.
10. Shimada M., Hernandez-Gonzalez I., Gonzalez-Robanya I., Richards J.S. Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol.*, 2006, Vol. 20, no. 12, pp. 3228-3239.
11. Thibault C., Levasseur M.C. Ovulation. *Hum. Reprod.*, 1988, Vol. 3, no. 4, pp. 513-523.

12. Wang C., Feng G., Shu J., Zhou H., Zhang B., Chen H., Lin R., Gan X., Wu Z., Wei T. Cumulus oophorus complexes favor physiologic selection of spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.*, 2018, Vol. 109, no. 5, pp. 823-831.
13. Wang J., Yin T., Liu S. Dysregulation of immune response in PCOS organ system. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1169232. doi: 10.3389/fimmu.2023.1169232.
14. Weidinger S., Mayerhofer A., Frungieri M.B., Meineke V., Ring J., Kohn F.M. Mast cell-sperm interaction: evidence for tryptase and proteinase-activated receptors in the regulation of sperm motility. *Hum. Reprod.*, 2003, Vol. 18, no. 12, pp. 2519-2524.

Авторы:

Валикова О.В. — младший научный сотрудник, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, врач-эндокринолог ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2; Клиника «Пластэк хирургия», г. Владивосток, Россия

Здор В.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-эндокринолог, Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

Authors:

Valikova O.V., Junior Research Associate, Pacific State Medical University; Endocrinologist, Regional Clinical Hospital No. 2; Clinic "Plastic Surgery", Vladivostok

Zdor V.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University; Endocrinologist, Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

Тихонов Я.Н. — старший преподаватель кафедры паталогической анатомии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Борода А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, заместитель директора по научной работе, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

Колбин К.Г. — к.б.н., эмбриолог, Клиника репродукции и генетики “Next Generation Clinic”, г. Владивосток, Россия

Tikhonov Ya.N., Senior Lecturer, Department of Pathological Anatomy, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Boroda A.V., PhD, Senior Research Associate, Laboratory of Cell Technology, Deputy Director for Scientific Activities, A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Kolbin K.G., PhD (Biology), Embryologist, Clinic for Reproduction and Genetics “Next Generation Clinic”, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 03.04.2024
Принята к печати 24.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 03.04.2024
Accepted 24.04.2024