

# ИССЛЕДОВАНИЕ ГОРМОН- И ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ СВЯЗЬ С ФЕРТИЛЬНОСТЬЮ ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

Валикова О.В.<sup>1,2,4</sup>, Здор В.В.<sup>1,4</sup>, Тихонов Я.Н.<sup>1</sup>, Борода А.В.<sup>3</sup>,  
Грачева А.М.<sup>5</sup>, Колбин К.Г.<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного  
отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

<sup>4</sup> Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

<sup>5</sup> Клиника репродукции и генетики Next Generation Clinic, г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Кумулюсные клетки — специализированный слой фолликулярных клеток, находящихся в тесном контакте с ооцитом, считаются косвенными маркерами их качества. Изменения этих клеток свидетельствует о повреждении яйцеклетки. Определение показателей цитокинов в культуре кумулюсных клеток может предопределить возможности зачатия и развития беременности. Целью исследования было получение первичной культуры КК от здоровых доноров и пациенток с СПКЯ, выявление наиболее значимых отличий в синтезе ключевых цитокинов в монокультурах кумулюсных клеток пациенток и здоровых лиц для прогнозирования результатов экстракорпорального оплодотворения. Использовался метод клеточных культур — кумулюсные клетки здоровых доноров и пациенток с синдромом поликистозных яичников, полученные после проведения трансвагинальной пункции фолликулов в программе экстракорпорального оплодотворения, что не нарушало права эмбриона, так как на этапе проведения процедуры ЭКО и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида, кумулюсные клетки не используются. Этический комитет протокол № 9 от 16.05.2022 г. В адгезивной культуре кумулюсных клеток методом ИФА на 1-е, 3-и, 7-е сутки эксперимента исследовались показатели IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  и прогестерона. Проводилось цитометрическое исследование кумулюсных клеток на 1-е, 3-и, 7-е сутки культивирования. Доказано — в адгезивной монокультуре кумулюсных

**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,  
А.М. Грачева, К.Г. Колбин «Исследование гормон-  
и цитокинпродуцирующей функции кумулюсных  
клеток человека и ее связь с фертильностью при  
синдроме поликистозных яичников» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3.  
С. 233–240. doi: 10.46235/1028-7221-9999-SOT

© Валикова О.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

O.V. Valikova, V.V. Zdor, Ya.N. Tikhonov, A.V. Boroda,  
A.M. Gracheva, K.G. Kolbin “Studies on the hormone and  
cytokine producing function of human cumulus cells and its  
interrelation with fertility in polycystic ovarian syndrome”,  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskij  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 233–240. doi: 10.46235/1028-  
7221-9999-SOT

© Valikova O.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9999-SOT

клеток продолжается секреция прогестерона, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ . В культуральной среде при СПКЯ на 7-е сутки происходило резкое возрастание уровня прогестерона ( $p < 0,01$ ), в отличие от доноров, где исходно увеличенное количество прогестерона значительно снижалось на 7-е сутки исследования. На 7-е сутки эксперимента в культуре кумулюсных клеток при СПКЯ значения IL-6, IL-10 увеличивались лишь двукратно, у здоровых доноров эти цитокины возрастали в 30 раз ( $p < 0,01$ ). За семь суток наблюдения происходило трехкратное снижение IFN $\gamma$  в культуре клеток при СПКЯ ( $p_{1-7} < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) по сравнению с культурой здоровых клеток, где показатели цитокина наоборот – возрастали в 20 раз ( $p_{1-7} < 0,01$ ), что определяло общий баланс цитокинов и, вероятно, определяло прогноз по вынашиванию беременности. Заключение: значимые разнонаправленные изменения уровня цитокинов в культуре кумулюсных клеток при СПКЯ и у здоровых лиц, могут стать определяющими факторами в формировании бластоцисты и сохранении эмбриона. Дальнейшее изучение продукции цитокинов и половых стероидов КК особенно актуально на 5-7-е сутки, когда происходит отбор ооцитов для вступления в цикл экстракорпорального оплодотворения. Изучение морфофункциональных свойств малоизученных клеток кумулюса методом клеточных культур позволит глубже исследовать механизмы нарушения фолликулогенеза при СПКЯ и, тем самым улучшить репродуктивный прогноз при данной патологии.

*Ключевые слова:* синдром поликистозных яичников, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , кумулюсные клетки, прогестерон

## STUDIES ON THE HORMONE AND CYTOKINE PRODUCING FUNCTION OF HUMAN CUMULUS CELLS AND ITS INTERRELATION WITH FERTILITY IN POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME

Valikova O.V.<sup>a, b, d</sup>, Zdor V.V.<sup>a, d</sup>, Tikhonov Ya.N.<sup>a</sup>, Boroda A.V.<sup>c</sup>, Gracheva A.M.<sup>e</sup>, Kolbin K.G.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Regional Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russian Federation

<sup>c</sup> A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

<sup>d</sup> Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

<sup>e</sup> Clinic of Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Cumulus cells (CC) are the specialized layer of follicular cells that are in close contact with the oocyte. They are considered as indirect markers of the oocyte quality. Changes of these cells suggest a damage of the ovary. Determination of cytokines in cumulus cell culture may predict the chance for the conception and development of pregnancy. The objective of the present study was to obtain a primary culture of CC from healthy donors and patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS), to identify the most significant differences in production of key cytokines in the CC monocultures of patients and healthy individuals in order to predict the results of *in vitro* fertilization. Materials and methods: the cell culture technique was used, i.e., cumulus cells of healthy donors and patients with polycystic ovary syndrome were obtained by transvaginal puncture of follicles in the *in vitro* fertilization (IVF) program. This procedure does not affect the rights of embryo, since the CC are not used at the stage of IVF procedure and intracytoplasmic sperm injection (Ethical Committee Protocol No. 9 of May 16, 2022). IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  and progesterone parameters were tested in adhesive cultures of CC by ELISA technique on days 1, 3, 7 of *in vitro* experiments. Results: We revealed a continuous secretion of progesterone, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  in adhesive monocultures of CC. In the patients with PCOS, we have found a sharp increase of progesterone level in cultural media ( $p < 0.01$ ) on the 7<sup>th</sup> day. By contrast, the initially increased progesterone levels proved to be significantly decreased in donors on the 7<sup>th</sup> day of culture. Moreover, in the culture of CC from patients with PCOS (7<sup>th</sup> day of the experiment), the values of IL-6, IL-10 increased only two-fold compared with 30-fold increase of these cytokines in healthy

donors ( $p < 0.01$ ). At the same term, we have observed a threefold decrease in  $IFN\gamma$  in the CC cultures of PCOS patients ( $p_{1-7} < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ) compared with cultured controls, which showed a 20-fold increase ( $p_{1-7} < 0.01$ ), thus determining differences in total cytokine balance and, probably, influencing the pregnancy prognosis. Conclusion: Significant multidirectional changes of cytokine levels in the culture of cumulus cells of the patients with PCOS and in healthy individuals may be regarded as determining factors in formation of blastocyst and preservation of the embryo. A further *in vitro* research on the production of cytokines and sex steroids by CC is especially important on day 5 to 7, when the oocytes are selected for entry into the *in vitro* fertilization cycle. The study of morpho-functional properties of little-studied cumulus cells using the cell culture technique will enable us for a deeper study on the mechanisms of disturbed folliculogenesis in PCOS, and, thereby, improve the reproductive prognosis in this disorder.

*Keywords:* polycystic ovarian syndrome, IL-6, IL-10,  $IFN\gamma$ , cumulus cells, progesterone

## Введение

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) является распространенным эндокринным и метаболическим заболеванием у репродуктивных женщин и характеризуется поликистозом яичников, гиперандрогенией и хронической ановуляцией [1]. Аномальный фолликулогенез считается общей характеристикой СПКЯ. Клинические и биохимические характеристики СПКЯ имеют типичную гетерогенность, но аномальное развитие фолликулов, вызывающее ановуляцию, является основной характеристикой СПКЯ [7]. В физиологично развивающемся фолликуле на этапе формирования полости внутри фолликула соматические клетки дифференцируются на два различных функционально и анатомических слоя: клетки выстилающие полость фолликула, ответственные за стероидогенез — клетки муральной гранулезы и кумулюсные клетки (КК), непосредственно контактирующие с ооцитом [2, 6]. КК находятся в тесном контакте с ооцитом, их морфофункциональные свойства влияют на качество яйцеклетки, поскольку отвечают за энергетический метаболизм, поддержку ионов, созревание и защиту женской гаметы, изменения в этих клетках могут нанести вред развитию фолликулов и свидетельствовать о повреждении яйцеклетки [11]. В физиологичных условиях КК будут сопровождать ооцит во время овуляции, при оплодотворении и в течение определенного времени после проникновения сперматозоида в яйцеклетку [2, 5, 6].

Возможность отделение клеток кумулюса от ооцита без нарушения его целостности во время проведения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), делает возможность изучить клетки в культуре [11]. Применение ЭКО у пациенток с СПКЯ, не всегда дает положительный результат [15]. В настоящее время продолжают научные дискуссии об уровне прогестерона при СПКЯ и его влиянии на исход беременности [8, 13]. При проведении вспомогательных репро-

дуктивных технологий (ВРТ) обязательной считается оценка качества ооцитов перед переносом эмбрионов. Ооциты в метафазе II очень хрупкие, неоднократное морфологическое исследование напрямую ухудшает качество и влияет на процесс имплантации эмбриона. Поэтому поиск неинвазивных биомаркеров, характеризующих комплекс кумулюсных клеток и ооцита, весьма актуален и может предопределить улучшение результатов беременности при СПКЯ [13].

В исследовании 2012 года представлено доказательство положительного влияния добавления рекомбинантного IL-6 при культивировании *in vitro* свиных диплоидных партенотов до стадии бластоцисты, в результате увеличивалось количество бластоцист, уменьшался апоптоз, снижалась экспрессия мРНК проапоптотического гена Casp3, увеличивались экспрессии антиапоптотического гена Bcl2 и Survivin, тем самым повышая жизнеспособность свиных эмбрионов [12]. Эти данные концептуально не противоречат полученными нами результатов (табл. 1, 2). В 2018 г. исследователи на экспериментальной модели животных с индуцированным дегидроэпандростероном СПКЯ, выявили более низкий уровень  $IFN\gamma$  по сравнению с контрольной группой животных [9]. Также зафиксирован более низкий уровень  $IFN\gamma$  в сыворотке крови женщин с СПКЯ, по сравнению со здоровыми женщинами, выявлено, что  $IFN\gamma$  способствует пролиферации, но ингибирует апоптоз гранулезных клеток яичника [9]. В ранее проведенных исследованиях [3, 4] выявлен более низкий уровень IL-10 у женщин с СПКЯ по сравнению с контрольной группой, при лечении IL-10 подавлялся стероидогенез и экспрессия воспалительных генов, что впоследствии может стать новым подходом к терапии СПКЯ [4]. Исследована роль передачи сигналов TGF- $\beta$  в регуляции опосредованной гиалуроновой кислотой экспансии кумулюса и овуляции в гранулезо-лютеиновых клетках человека. Молекулярные механизмы, с помощью которых TGF- $\beta$  регулирует синтез гиалуроно-

вой кислоты в клетках КК, до конца не ясны, но требуют изучения из-за своей значимости [14]. В исследовании 2018 года изучали влияние IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  на рост и созревание ооцитов из небольших фолликулов во время созревания *in vitro*, кумулюс-ооцитарные комплексы культивировали с добавлением IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в течении 48 часов. В результате ооциты, культивируемые с добавлением IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , имели больший диаметр в сравнении с контролем [10]. В ряде исследований [6, 8, 11] доказано, что на исход беременности влияют морфофункциональные свойства

КК, которые целесообразно изучать в культуре клеток, что может прояснить механизмы нарушений формирования эмбриона и увеличить процент положительных исходов беременности. Целью исследования было получение первичной культуры КК от здоровых доноров и пациенток с СПКЯ, выявление наиболее значимых отличий в синтезе ключевых цитокинов в монокультурах кумулюсных клеток пациенток и здоровых лиц для прогнозирования результатов экстракорпорального оплодотворения.

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА И ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ В РАЗНЫЕ СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 1. CONTENT OF PROGESTERONE AND CYTOKINES IN THE CULTURE MEDIUM IN POLYCYSTIC OVARY SYNDROME ON DIFFERENT DAYS OF THE EXPERIMENT

Показатель, нг/мл Index, ng/mL	1-е сутки 1 <sup>st</sup> day	3-и сутки 3 <sup>rd</sup> day	7-е сутки 7 <sup>th</sup> day	Значение p Value p
Прогестерон Progesteron	10,09 $\pm$ 0,14	82,70 $\pm$ 0,43	323,70 $\pm$ 5,43	p < 0,05, (p <sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> < 0,01)
IL-6	20,40 $\pm$ 0,52	32,70 $\pm$ 0,43	45,600 $\pm$ 0,423	p < 0,05; (p <sub>1-3, 1-7</sub> < 0,05)
IL-10	3,66 $\pm$ 0,06	4,57 $\pm$ 0,05	6,56 $\pm$ 0,07	p < 0,05, (p <sub>1-7</sub> < 0,05)
IFN $\gamma$	6,24 $\pm$ 0,03	3,26 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,01	p < 0,05 (p <sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> < 0,05)

Примечание. p – статистическая значимость различий (p < 0,05; p < 0,01 по t-критерию Стьюдента) между показателями у женщин при СПКЯ и у здоровых женщин (p<sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> – где <sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> отличия между сутками в одном показателе в одной культуральной среде).

Note. p, statistical significance of differences (p < 0.05; p < 0.01 according to Student's t-test) between indicators in women with PCOS and in healthy women (p<sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> where <sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> differences between days in one indicator in one culture medium).

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА И ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ В РАЗНЫЕ СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 2. CONTENT OF PROGESTERONE AND CYTOKINES IN THE CULTURE MEDIUM OF HEALTHY DONORS ON DIFFERENT DAYS OF THE EXPERIMENT

Показатель, нг/мл Index, ng/mL	1-е сутки 1 <sup>st</sup> day	3-и сутки 3 <sup>rd</sup> day	7-е сутки 7 <sup>th</sup> day	Значение p Value p
Прогестерон Progesteron	14,50 $\pm$ 0,36	110,00 $\pm$ 2,12	58,25 $\pm$ 0,40	p < 0,05; (p <sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> < 0,05)
IL-6	6,34 $\pm$ 0,30	16,35 $\pm$ 0,34	187,53 $\pm$ 0,65	p < 0,05; (p <sub>1-3, 3-7, 1-7</sub> < 0,01)
IL-10	1,74 $\pm$ 0,57	2,37 $\pm$ 0,79	30,16 $\pm$ 0,80	p < 0,05; (p <sub>3-7, 1-7</sub> < 0,01)
IFN $\gamma$	3,27 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,03	71,91 $\pm$ 0,31	p < 0,05; (p <sub>3-7, 1-7</sub> < 0,01)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

## Материалы и методы

Проведение исследования одобрено Междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 16.05.2022 г.). КК были получены от 11 здоровых доноров (средний возраст  $28,6 \pm 5,3$  года) и 10 пациенток с СПКЯ (средний возраст  $29,4 \pm 3,3$  года), обратившихся в клинику репродукции г. Владивостока и прошедших процедуру ЭКО/ИКСИ. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В работе использовали КК, которые стандартно утилизируют после проведения манипуляции отделения от ооцита, они не требуются в дальнейшей процедуре ЭКО/ИКСИ. Клетки получали после проведения трансвагинальной пункции в условиях стерильной операционной в асептических условиях. Стимуляцию яичников проводили перед забором материала по стандартным протоколам ЭКО путем введением рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека и высокоочищенного менопаузального гонадотропина человека в индивидуальных дозах согласно протокола введения антагонистов гонадотропин-рилизинг-гормона. Овуляцию индуцировали реузс-хорионическим гонадотропином (рчХГ), чтобы вызвать созревание ооцитов на 9-12-й день после первоначального введения гонадотропина. Забор ооцитов стандартно проводили в клинике репродукции человека с помощью трансвагинального УЗИ через 36 ч после введения рчХГ. Отделение КК от ооцита без нарушения его целостности позволяет использовать обычно утилизируемые КК для дальнейшего исследования, что никак не нарушает права эмбриона.

После забора ооцитов происходит механическое удаление окружающих ооцита соматических клеток — *corona radiata* и *cumulus oophorus*. Осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут при комнатной температуре (RT). Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в среде Искова (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, США), содержащей 20% эмбриональной бычьей сыворотки, 1 раствор заменимых аминокислот (MEM NEAA, Gibco, США); 1,2 мМ  $\alpha$ -тиолицерола (Sigma-Aldrich, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл пенициллина (Sigma-Aldrich), 100 мкг/мл антимикробного агента Primocin™ (InvivoGen, США). Клетки распределяли в лунки 12-луночного планшета для адгезионных культур клеток (ТРР, Швейцария) с конечным объемом среды в лунке 1 мл. Культивирование проводили при  $+37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  и влажности 95%. Через 24 ч культивирования производили смену среды. Последующую смену среды производили на 3-и, 7-е сутки культивирования. В среде определяли

уровень прогестерона, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  на 1-е, 3-и, 7-е сутки культивирования. 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).

Анализ состояния клеток осуществляли с помощью окрашивания флуоресцентными красителями с последующей проточной цитометрией. Клетки открепляли из лунок планшета с помощью смеси 0,05% трипсина-0,02% EDTA (Sigma-Aldrich), 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 погибающие клетки, H2DCFDA (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 10 мкг/мл для окрашивания клеток 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).

## Результаты и обсуждение

Показатели содержания в культуральных средах прогестерона, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  у здоровых доноров и при СПКЯ представлены в таблицах 1, 2. В исследовании установлено, что в получаемой адгезивной культуре КК продолжается синтез прогестерона, IL-6, IL-10 данными клетками (табл. 1, 2). Исключение составила культура клеток при СПКЯ, в которой продукция, IFN $\gamma$  прогрессивно снижалась по сравнению с контролем, и к 7-му дню эксперимента была зафиксирована на минимальном уровне (табл. 1).

При сравнимом исходном уровне прогестерона в обеих клеточных культурах — при СПКЯ и здоровых доноров, и на 3-и сутки эксперимента показатели гормона оставались соизмеримыми, но на 7-е сутки зафиксировано резкое возрастание значений прогестерона при СПКЯ ( $p < 0,01$ ), что вполне согласуется с данными исследований о негативном прогнозе ЭКО при СПКЯ при значимом нарастании значений прогестерона в крови пациенток [8, 15]. Ряд авторов указывали на сниженный потенциал развития ооцитов у пациенток с СПКЯ и его зависимости от уровня

прогестерона, который тесно связан с наступлением беременности, трансформацией эндометрия из пролиферативной стадии в секреторную, имплантацию и роста эмбриона [3, 8, 15]. Наши данные на монокультуре КК отчетливо доказывают эту зависимость от прогестерона, указанную в клинических исследованиях. Раннее повышение прогестерона при СПКЯ расширяет «окно рецептивности» эндометрия, что приводит к асинхронности между эндометрием и эмбрионом, и, следовательно, к неудаче имплантации и исхода беременности [8, 15]. Возможно, учитывая наши данные, гиперпродукция прогестерона обеспечивается КК, и ее ранняя верификация позволит таргетно корректировать проблему в будущем.

Содержание IL-6 при СПКЯ исходно значимо (более чем в 3 раза) превышало аналогичный показатель здоровых доноров (табл. 1, 2), но темпы нарастания цитокина у здоровых лиц были значимо выше, и через 7 дней эксперимента IL-6 у них зафиксирован в 4 раза выше, чем в группе СПКЯ. Этот феномен может свидетельствовать о релевантном истощении функционального потенциала КК. Аналогичная ситуация имела место в содержании IL-10 в культуральных средах: при исходно более высоком уровне цитокина при СПКЯ, темпы его нарастания и, следовательно, синтеза клетками при СПКЯ вначале замедля-

лись (к 3-м суткам), а затем резко снижались к 7-м суткам по сравнению со здоровыми женщинами (табл. 1, 2). Данные также подтверждают высказанное выше предположение о функциональном дефиците КК при СПКЯ в плане продукции цитокинов.

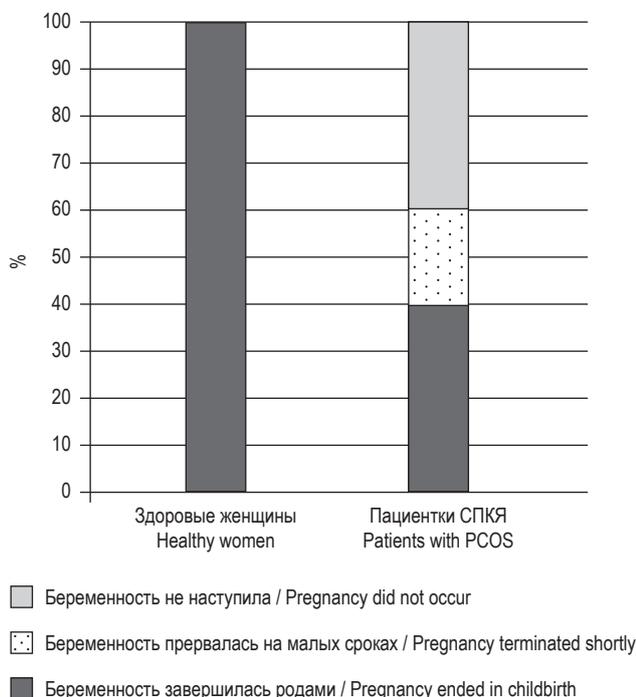
Содержание IFN $\gamma$  в культуре КК здоровых женщин было исходно в 2 раза ниже, чем при СПКЯ (табл. 1, 2). Однако на 7-е сутки, синтез IFN $\gamma$  клетками обеих групп резко снизился (табл. 1, 2). Более резкое и значимое снижение синтеза IFN $\gamma$  клетками при СПКЯ через неделю эксперимента нарушило исходно вполне релевантный баланс цитокинов: исходно соотношение IFN $\gamma$ /IL-10 при СПКЯ составило 1,7 против 1,88 у здоровых доноров. После 7 дней культивирования КК, баланс синтезируемых при СПКЯ цитокинов (IFN $\gamma$ /IL-10) резко снизился до 0,27 против 2,38 у здоровых лиц, что ясно демонстрирует глубину тканевого дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов при поликистозе яичников и истощение функциональных свойств КК при СПКЯ.

Значимые разнонаправленные изменения уровня цитокинов в монокультуре кумулюсных клеток при СПКЯ, по сравнению со здоровыми донорами, могут служить определяющими факторами формирования бластоцистов и, следовательно, исхода беременности при ЭКО. Дальнейшее изучение этого вопроса весьма актуально, так как именно на 5-7-е сутки формирования бластоцистов происходит отбор ооцитов для вступления в цикл экстракорпорального оплодотворения. Изменение показателей цитокинов в культуре клеток и результаты наступления беременности у этих женщин (рис. 1) дают возможность прогнозировать результаты вспомогательных репродуктивных технологий и, в дальнейшем, корректировать эти нарушения с помощью восстановления баланса цитокинов. Для пациенток с синдромом поликистозных яичников проведение успешной вспомогательной репродуктивной технологии является зачастую единственным шансом реализовать свой репродуктивный потенциал.

## Выводы

1. Содержание и синтез прогестерона в монокультурах кумулюсных клеток у здоровых женщин и пациенток с СПКЯ имеет значимые отличия, избыточная активация стероидпродуцирующей функции КК при СПКЯ продемонстрирована в резком возрастании значений прогестерона в этой культуре КК в сравнении со здоровыми клетками через 7 дней наблюдения.

2. Продукция и динамика синтеза IFN $\gamma$  в монокультурах кумулюсных клеток здоровых лиц и при СПКЯ имеет значимые отличия. Резкое



**Рисунок 1. Данные по результатам ЭКО у здоровых женщин, принимавших участие в исследовании, и при синдроме поликистозных яичников**

Figure 1. Data from IVF results in healthy women and those with polycystic ovary syndrome who participated in the study

снижение синтеза исходно более высокого  $IFN\gamma$  при СПКЯ через неделю эксперимента значимо нарушило баланс цитокинов – снизился показатель  $IFN\gamma / IL-10$  при СПКЯ в 8,8 раза по сравнению со здоровыми клетками, что ясно демонстрирует глубину тканевого дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов при поликистозе яичников и истощение цитокинпродуцирующих функциональных свойств КК при СПКЯ.

3. При анализе результатов синтеза  $IL-6$  в монокультурах кумулюсных клеток выявлены значимые отличия функции здоровых клеток: содержание  $IL-6$  при СПКЯ имело трехкратно превышение исходно, но темпы нарастания ци-

токина у здоровых КК за 7 дней превысили КК при СПКЯ и значимо возросли (в 4 раза) в конце эксперимента.

4. Синтез  $IL-10$  и его динамика в монокультурах кумулюсных клеток также имел значимые отличия – при более высоком исходном уровне цитокина при СПКЯ, темпы его нарастания и, следовательно, синтеза кумулюсными клетками в первые трое суток замедлялись, а затем резко снижались к 7-м суткам эксперимента по сравнению со здоровыми КК. Результаты исследования цитокинов в монокультурах ясно свидетельствуют о феномене активационного истощения КК при СПКЯ.

## Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Андреева Е.Н., Абсаратова Ю.С., Гаспарян С.А., Григорян О.Р., Дедов И.И., Карахалис Л.Ю., Мельниченко Г.А., Сутурина 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). М.: Минздрав России, 2021. 61 с. [Adamyan L.V., Andreeva E.N., Absatarova Yu.S., Grigoryan O.R., Dedov I.I., Karacharis L. Yu., Melnichenko G.A., Suturina L.V., Filippov O.S., Chernukha G.E., Sheremetyeva E.V., Yarmolinskaya M.I. Polycystic ovary syndrome in the reproductive age (modern approaches to diagnosis and treatment): Clinical recommendations (treatment protocol)]. Moscow: Ministry of Health of Russia, 2021. 61 p.
2. Arroyo A., Kim B., Yeh J. Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact. *Reprod. Sci.*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 1223-1252.
3. Artimani T., Karimi J., Mehdizadeh M., Yavangi M., Khanlarzadeh E., Ghorbani M., Asadi S., Kheiripour N. Evaluation of pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol. Endocrinol.*, 2018, Vol. 34, no. 2, pp. 148-152.
4. Chugh R.M., Park H.S., El Andaloussi A., Elsharoud A., Esfandyari S., Ulin M., Bakir L., Aboalsoud A., Ali M., Ashour D., Igboeli P., Ismail N., McAllister J., Al-Hendy A. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10. *Stem Cell Res. Ther.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 388. doi: 10.1186/s13287-021-02472-w.
5. Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*, 2008, Vol. 14, no. 2, pp. 159-177.
6. Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol. Hum. Reprod.*, 2010, Vol. 16, no. 10, pp. 715-725.
7. Huang X., Wu B., Chen M., Hong L., Kong P., Wei Z., Teng X. Depletion of exosomal circLDLR in follicle fluid derepresses miR-1294 function and inhibits estradiol production via CYP19A1 in polycystic ovary syndrome. *Aging (Albany NY)*, 2020, Vol. 12, no. 15, pp. 15414-15435.
8. Labarta E, Martínez-Conejero J.A., Alamá P., Horcajadas J.A., Pellicer A., Simón C., Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, no. 7, pp. 1813-1825.
9. Li Y., Zheng Q., Sun D., Cui X., Chen S., Bulbul A., Liu S., Yan Q. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *J. Cell. Physiol.*, 2019, Vol. 234, no. 5, pp. 7435-7447.
10. Lima F., Bezerra F., Souza G.B., Matos M., van den Hurk R., Silva J. Influence of interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha on the in vitro growth, maturation and mitochondrial distribution of bovine oocytes from small antral follicles. *Zygote*, 2018, Vol. 26, no. 5, pp. 381-387.
11. Tahajjodi S.S., Farashahi Y.E., Agha-Rahimi A., Aflatoonian R., Khalili M.A., Mohammadi M., Aflatoonian B. Biological and physiological characteristics of human cumulus cells in adherent culture condition. *Int. J. Reprod. BioMed*, 2020, Vol. 18, no. 1, pp. 1-10.
12. Shen X.H., Cui X.S., Lee S.H., Kim N.H. Interleukin-6 enhances porcine parthenote development in vitro, through the IL-6/Stat3 signaling pathway. *J. Reprod. Dev.*, 2012, Vol. 58, no. 4, pp. 453-460.
13. Sayutti N., Abu M.A., Ahmad M.F. PCOS and role of cumulus gene expression in assessing oocytes quality. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2022, Vol. 13, 843867. doi: 10.3389/fendo.2022.843867.

14. Wang F, Chang H.M., Yi Y., Li H., Leung P.C.K. TGF- $\beta$ 1 promotes hyaluronan synthesis by upregulating hyaluronan synthase 2 expression in human granulosa-lutein cells. *Cell. Signal.*, 2019, Vol. 63, 109392. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109392.
15. Yang Y., Liu B., Wu G., Yang J.. Exploration of the value of progesterone and progesterone/estradiol ratio on the hCG trigger day in predicting pregnancy outcomes of PCOS patients undergoing IVF/ICSI: a retrospective cohort study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 184. doi: 10.1186/s12958-021-00862-6.
16. Wang T.J., Zhang F., Richards J.B., Kestenbaum B., van Meurs J.B., Berry D., Kiel D.P., Streeten E.A., Ohlsson C., Koller D.L., Peltonen L., Cooper J.D., O'Reilly P.F., Houston D.K., Glazer N.L., Vandenput L., Peacock M., Shi J., Rivadeneira F., McCarthy M.I., Anneli P., de Boer I.H., Mangino M., Kato B., Smyth D.J., Booth S.L., Jacques P.F., Burke G.L., Goodarzi M., Cheung C.L., Wolf M., Rice K., Goltzman D., Hidioglou N., Ladouceur M., Wareham N.J., Hocking L.J., Hart D., Arden N.K., Cooper C., Malik S., Fraser W.D., Hartikainen A.L., Zhai G., Macdonald H.M., Forouhi N.G., Loos R.J., Reid D.M., Hakim A., Dennison E., Liu Y., Power C., Stevens H.E., Jaana L., Vasani R.S., Soranzo N., Bojunga J., Psaty B.M., Lorentzon M., Foroufard T., Harris T.B., Hofman A., Jansson J.O., Cauley J.A., Uitterlinden A.G., Gibson Q., Jarvelin M.R., Karasik D., Siscovick D.S., Econs M.J., Kritchevsky S.B., Florez J.C., Todd J.A., Dupuis J., Hyppönen E., Spector T.D. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet*, 2010, Vol. 376, pp. 180-188.

**Авторы:**

**Валикова О.В.** — врач-эндокринолог ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2»; Клиника диабета и эндокринных заболеваний, 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

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

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

**Грачева А.М.** — главный врач, врач — акушер-гинеколог, Клиника репродукции и генетики Next Generation Clinic, г. Владивосток, Россия

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

**Authors:**

**Valikova O.V.**, Clinical Endocrinologist, Pacific State Medical University; Regional Clinical Hospital No. 2; Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

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

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

**Boroda A.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Deputy Director for Research, A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Gracheva A.M.**, Chief Physician, Obstetrician-Gynecologist, Clinic of Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

**Kolbin K.G.**, PhD (Biology), Embryologist, Clinic of Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

Поступила 15.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Принята к печати 06.07.2023

Received 15.05.2023

Revision received 29.06.2023

Accepted 06.07.2023