

УДК 57.085.23, 618.14, 577.334

ОЦЕНКА УРОВНЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С
ДИАГНОЗОМ «ЭНДОМЕТРИОЗ»

Погонялова М.Ю. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия),

Попов Д.Ю. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия),

Кузнецова Е.А. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)

Научный руководитель – кандидат технических наук Винокуров А.Ю.

(Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет
имени И.С. Тургенева, Орел, Россия)

Работа посвящена определению скорости, а также источника продукции активных форм кислорода (АФК) и содержания эндогенного антиоксиданта, восстановленного глутатиона (GSH), в клетках различных типов тканей пациентов с установленным диагнозом «эндометриоз».

Введение. Эндометриоз – хроническое заболевание репродуктивной системы у женщин, сущность которого заключается в разрастании тканей, идентичных по структуре и функции с эндометрием, но выходящих за пределы границ нормальной локализации слизистой оболочки матки. В структуре гинекологических заболеваний эндометриоз занимает третье место, но его частота имеет тенденцию к увеличению. Во всем мире эндометриоз поражает примерно 10-15% женщин репродуктивного возраста. В настоящее время в развитии эндометриоза большое внимание уделяют окислительному стрессу как дисбалансу между образованием и нейтрализацией АФК, что может вызывать общую воспалительную реакцию и способствовать развитию патологии. Это приводит к повреждениям мембранных структур, белков и ДНК, которые могут быть критическими для клеток. Количество источников АФК в клетке весьма велико. В частности, они могут образовываться в результате утечки электронов с I и III комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий. Во многих клетках значительный вклад в общий пул АФК вносит NADPH-оксидаза, генерирующая супероксид-анион. Определение источников АФК, а также антиоксидантного статуса клеток в случае конкретного патологического процесса, представляет актуальную задачу как с позиции понимания механизмов развития заболевания, так и поиска возможных терапевтических мишеней при лечении.

Основная часть. Исследования проводили на клетках, выделенных из тканей пациентов с диагнозом «эндометриоз», а также условно-здоровых пациентов в соответствии с решением Этического комитета ОГУ имени И.С. Тургенева (протокол № 23 от 29 октября 2021 года). Все пациенты (39 человек) дали письменное согласие на участие в научном исследовании. В исследовании использованы образцы: аспират условно-здоровых пациентов, аспират и миометрий при аденомиозе, ткань кисты и аспират при эндометриозе, ткань кисты яичника, а также яичника при эндометриозе. Сразу после отбора пробы помещали в среду RPMI 1640, содержащую 0,25 % трипсина, и выдерживали при температуре 4°C в течение 16-20 часов. Затем пробы трижды отмывали от трипсина средой DMEM, после чего выдерживали в течение 30 минут в 0,2 %-ном растворе коллагеназы I типа при температуре 37 °C с последующей отмывкой тканей с помощью среды DMEM. Суспензию первично выделенных клеток получали путем механического диспергирования полученных тканей. Культивирование клеток осуществляли в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 1% пирувата и 1% PenStrep. Изучение параметров окислительного стресса на клеточных культурах проводили при помощи конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2, а также установки Cairn Research Ltd на базе флуоресцентного микроскопа Olympus IX73P1F. Для оценки скорости продукции АФК использовали флуоресцентный зонд dihydroetidium (HEt) (5 мкМ), продукты окисления которого в результате интеркаляции в ДНК флуоресцируют при возбуждении излучением на длине волны возбуждения 500 нм и

эмиссии – 590 нм. Эксперимент проводили без предварительной инкубации клеток, чтобы избежать токсического эффекта продуктов окисления. Для оценки содержания GSH использовали флуоресцентный зонд monochlorobimane (MCB) (50 мкМ), который в результате взаимодействия с GSH приобретает способность к флуоресценции (максимум поглощения – 394 нм, максимум флуоресценции – 490 нм). Клетки инкубировали с красителем в течение 30 мин при 37°C, после чего получали изображения с 2-3 участков покровного стекла в нескольких проекциях. Оценку скорости образования АФК в митохондриях проводили с использованием флуоресцентного зонда MitoTracker Red CM-H2Xros (500 нМ), который способен накапливаться в митохондриях и, в результате взаимодействия с АФК, приобретает способность к флуоресценции с максимумом поглощения на длине волны 561 нм. Перед исследованием клетки инкубировали в течение 30 мин. Для оценки уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) был использован флуоресцентный зонд BODIPY 581/591 C-11 (2 мкМ), который представляет собой липофильный краситель, накапливающийся в мембранах. В результате окисления максимум флуоресценции зонда смещается с 591 нм до 510 нм. Образование АФК с HEt и MitoTracker Red CM-H2Xros, а также ПОЛ оценивали по скорости изменения уровня флуоресценции (в случае MitoTracker Red CM-H2Xros) или соотношения интенсивности флуоресценции при возбуждении длинами волн 530 нм и 360 нм (для HEt) и 488 нм и 561 нм (для BODIPY 581/591 C-11).

Выводы. Анализ данных с использованием HEt показал, что в клетках с патологиями наблюдается повышенный уровень продукции АФК. В клетках кисты яичника и аспирата при эндометриозе этот показатель по сравнению с контролем выше почти в 2 раза, в клетках миометрия при аденомиозе – на 30%. При этом уровень GSH варьируется в зависимости от типа клеток. Высокое содержание GSH, в 2,5 раза выше контрольных значений, было обнаружено в образцах аспирата при эндометриозе. Эти данные могут свидетельствовать о том, что патология является хронической и патологические клетки адаптированы к высокому уровню АФК. Уровень GSH в аспирате при аденомиозе на 30% снижен по сравнению с контролем, что говорит об остро протекающей патологии. Уровень GSH в клетках миометрия при аденомиозе, а также в клетках кисты яичника находится на одном уровне с контролем. Наряду с этим повышенный уровень ПОЛ говорит о развитии в данных клетках окислительного стресса. Наиболее высокая скорость ПОЛ отмечается в ткани яичника пациента с эндометриозом – она возрастает по сравнению с контрольным образцом в 3 раза, в клетках миометрия и аспирате при аденомиозе – в 1,5 раза, значения в клетках кисты находятся на уровне с контролем. Пониженный (на 36 %) уровень ПОЛ обнаружен только в образце аспирата при эндометриозе. В аспекте образования митохондриальных АФК между контрольным образцом и образцами с патологиями не наблюдается статистической разницы. Из этого следует вывод, что АФК, вызывающие окислительный стресс в клетках, образуются именно в цитоплазме. В ходе исследования было выявлено, что в присутствии ингибиторов NADPH-оксидазы, AEBSF и DPI, продукция АФК существенно уменьшается. Так в клетках кисты яичника в эксперименте с ингибитором продукция АФК уменьшается почти в 2 раза в сравнении с экспериментом без добавления ингибитора, а в клетках аспирата при эндометриозе – в 3 раза. Это говорит об основном вкладе NADPH-оксидазы в наблюдаемую сверхпродукцию АФК, что делает данный фермент одной из потенциальных фармакологических мишеней. В целом, регуляция редокс-баланса в клетках в дальнейшем может помочь в лечении эндометриоза

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15-2019-1877.

Погонялова М.Ю. (автор)

Подпись

Винокуров А.Ю. (научный руководитель)

Подпись

