

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ГОНАДОТРОПНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ
В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ПСИХОСОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА
НА КАЧЕСТВО ООЦИТОВ МЫШЕЙ**

© 2024 г. Д. А. Лебедева¹, Т. Н. Игонина^{1, *}, Е. Ю. Брусенцев¹, Н. А. Шавшаева^{1,2},
С. Я. Амстиславский¹

¹*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия*

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

**E-mail: egik_00@mail.ru*

Поступила в редакцию 22.03.2024 г.

После доработки 26.04.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

Хронический психосоциальный стресс может оказывать негативное влияние на женскую репродуктивную систему. Между тем влияние стимуляции яичников гонадотропинами на фоне стресса на качество ооцитов остается слабо изученным. Целью настоящей работы было изучение влияния хронического психосоциального стресса на качество кумулюс-ооцитных комплексов у мышей при естественном эстральном цикле, а также при стимуляции яичников экзогенными гонадотропинами, что является важной частью современного комплекса вспомогательных репродуктивных технологий. Результаты исследования показали, что психосоциальный стресс не влияет на число овулирующих ооцитов, однако ухудшает их качество, выражающееся в сниженном проценте зрелых форм. Кроме того, у самок мышей на фоне стресса было обнаружено повышенное накопление активных форм кислорода в ооцитах, сопровождающееся повышенным апоптозом в кумулюсных клетках. Гормональная стимуляция яичников с помощью гонадотропинов оказывала смягчающий эффект на негативные изменения, связанные с психосоциальным стрессом, нормализуя уровень накопления активных форм кислорода в ооцитах и снижая уровень апоптоза в кумулюсных клетках.

Ключевые слова: хронический психосоциальный стресс, гонадотропины, кумулюс-ооцитные комплексы, окислительный стресс, апоптоз, мыши

DOI: 10.31857/S0869813924060044, EDN: BFBDSK

ВВЕДЕНИЕ

Проблема бесплодия на сегодняшний день является актуальной во всем мире. Доля пар репродуктивного возраста неспособных зачать ребенка без помощи медицины колеблется от 12.6 до 17.5% [1]. Причины, лежащие в основе возникновения бесплодия, условно можно разделить на две большие группы: патологии репродуктивной системы и образ жизни человека [2]. Причем во втором случае взаимосвязь между причиной и следствием достаточно размыта. В последнее время исследователи ставят вопрос

о роли хронического психосоциального стресса в нарушении фертильности, что связано с ускорением ритма современной жизни, способствующим повышению психической и эмоциональной нагрузки на человека [3].

Известно, что хронический стресс может приводить к нарушениям в женской репродуктивной системе, в частности, к недоразвитию фолликулов, ановуляции и недостаточности лютеиновой фазы вследствие ослабления функции желтого тела [4, 5]. Более того, стрессорные воздействия могут приводить к снижению качества ооцитов и, как следствие, к снижению жизнеспособности преимплантационных эмбрионов [6, 7]. Однако механизмы влияния психологического стресса на репродуктивную функцию недостаточно изучены.

Негативное влияние хронического стресса на яичник рассматривается в основном через взаимодействие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГС) систем [8, 9]. В ответ на стрессорные воздействия происходит активация ГГНС, что сопровождается высвобождением глюкокортикоидов [10]. При этом ГГНС опосредованно влияет на рост и созревание половых клеток, синтез стероидных гормонов в яичниках, воздействуя на ГГГС. Известно, что глюкокортикоиды угнетающе воздействуют на органы женской репродуктивной системы [9, 11]. Между тем относительно недавно был открыт и исследован гонадотропин-ингибирующий гормон (ГниГ, гонадоингибин), являющийся важной частью ГГНС; этот нейрогормон синтезируется в мозге и может влиять на активность ГГГС и половое поведение [12]. При стрессе происходит усиление активности нейронов, выделяющих ГниГ, при этом снижается высвобождение гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), из-за чего нарушается секреция фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. В совокупности это оказывает негативный эффект на функции яичников [10].

В связи с бурным развитием и широким внедрением в практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [13] все чаще встает вопрос о том, каким образом и посредством каких механизмов психоэмоциональный стресс может повлиять на репродуктивные исходы [3]. Ранее было показано, что психологический стресс может оказывать влияние на результативность применения ВРТ для лечения бесплодия [14].

Стимуляция яичников гонадотропинами является важнейшей частью современного комплекса ВРТ в медицине [15, 16]. Кроме того, гонадотропная стимуляция яичников применяется в подавляющем большинстве исследований на лабораторных мышах и других животных с целью получения ооцитов и преимплантационных эмбрионов [17, 18]. Между тем влияние стимуляции гонадотропинами на качество ооцитов на фоне стресса остается слабо изученным [19, 20]. Вопрос о том, возможно ли введением экзогенных гонадотропинов смягчить негативные эффекты хронического стресса на функцию яичников, и как это скажется на качестве ооцитов остается до сих пор открытым.

Для изучения влияния хронического психосоциального стресса на репродуктивную систему используют как сбор клинических данных [2, 21], так и исследования на экспериментальных животных [9, 22]. При этом популярны модели хронического непредсказуемого стресса, при котором животное помещается в непредсказуемые стрессорные ситуации, и рестрикционная модель, включающая ограничение подвижности животного [3, 23]. Существенным недостатком данных моделей является то, что в них используются виды стресса, не имеющие сходства с повседневными стрессовыми факторами современного человека. Кроме того, эти модели приводят к потере веса, что негативно сказывается на физическом состоянии животных [24]. Одним из наиболее адекватных подходов для моделирования хронического психосоциального стресса является, на наш взгляд, чередование изоляции и скученности, что позволяет вызывать психогенный стресс без физического воздействия на животного [25].

Целью нашего исследования явилось изучение эффектов хронического психосоциального стресса на качество ооцитов мышей при естественном эстральном цикле, а также при применении стимуляции яичников экзогенными гонадотропинами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследования проводили на мышах линии CD1 из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках размерами 36 x 25 x 14 см (длина x ширина x высота) с подстилом из древесной стружки, при температуре 22–24 °С, цикл день/ночь: 14 ч/10 ч (рассвет в 3 ч ночи), влажность 40–50%, со свободным доступом к стандартному корму (V1534–300, Ssnif, Soest, Германия) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками (Северянка, Экопроект, Россия). Эксперименты были проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Дизайн эксперимента

Самки мышей в возрасте 8–12 недель были случайным образом распределены на четыре группы (рис. 1):

- 1) Контроль (естественный эстральный цикл, без стрессирующих воздействий);
- 2) Контроль + СО (индуцированная суперовуляция, без стрессирующих воздействий);
- 3) Стресс (естественный эстральный цикл, воздействие стрессирующих факторов);
- 4) Стресс + СО (индуцированная суперовуляция, воздействие стрессирующих факторов).

Хронический психосоциальный стресс был вызван согласно ранее описанной методике [25], а именно: животных опытной группы содержали в изоляции (по одной самке в клетке) в течение 11 дней с последующим нахождением животных в условиях скученности (по 11 самок в клетке) последующие 10 дней (рис. 1). Таким образом, длительность эксперимента составляла 21 день. Животных контрольной группы содержали в стандартных условиях в группах по 5 самок на клетку. Эффективность применяемой процедуры для вызывания стрессовой реакции была подтверждена ранее [25] посредством определения уровня кортикостерона в плазме крови.

У самок мышей определяли стадию цикла по вагинальным мазкам как описано ранее [26]. Для гормональной стимуляции яичников (группы Контроль + СО и Стресс + СО) самкам мышей на стадии диэструса вводили внутримышечно 10 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, фоллигон, Intervet, Нидерланды), затем, через 46 ч внутримышечно вводили 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, хорулон, Intervet, Нидерланды), что является общепринятым протоколом стимуляции яичников мышей [27]. Для исследования самок с естественным эстральным циклом (группы Контроль и Стресс) были взяты только самки на стадии эструса. По окончании эксперимента мышей подвергали эвтаназии с помощью CO₂, затем собирали кумулюсоцитные комплексы для последующих исследований (рис. 1).

Исследование крови на уровень кортикостерона

Туловищную кровь (0.5–0.7 мл) собирали в центрифужные пробирки после декапитации животных, отстаивали в течение 25 мин при комнатной температуре до полного образования сгустка, центрифугировали (850 g, 10 мин) при комнатной температуре; экстрагированную сыворотку хранили при –20 °С до анализа гормонов. Концентрацию сывороточного кортикостерона измеряли методом иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa (Cloud-Clone Corp., США) согласно инструкции производителя. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью планшет-ридера (Thermo Fisher Scientific, США) через 15 мин после остановки реакции добавлением стоп-раствора. Концентрацию кортикостерона рассчитывали по соответствующей калибровочной кривой.

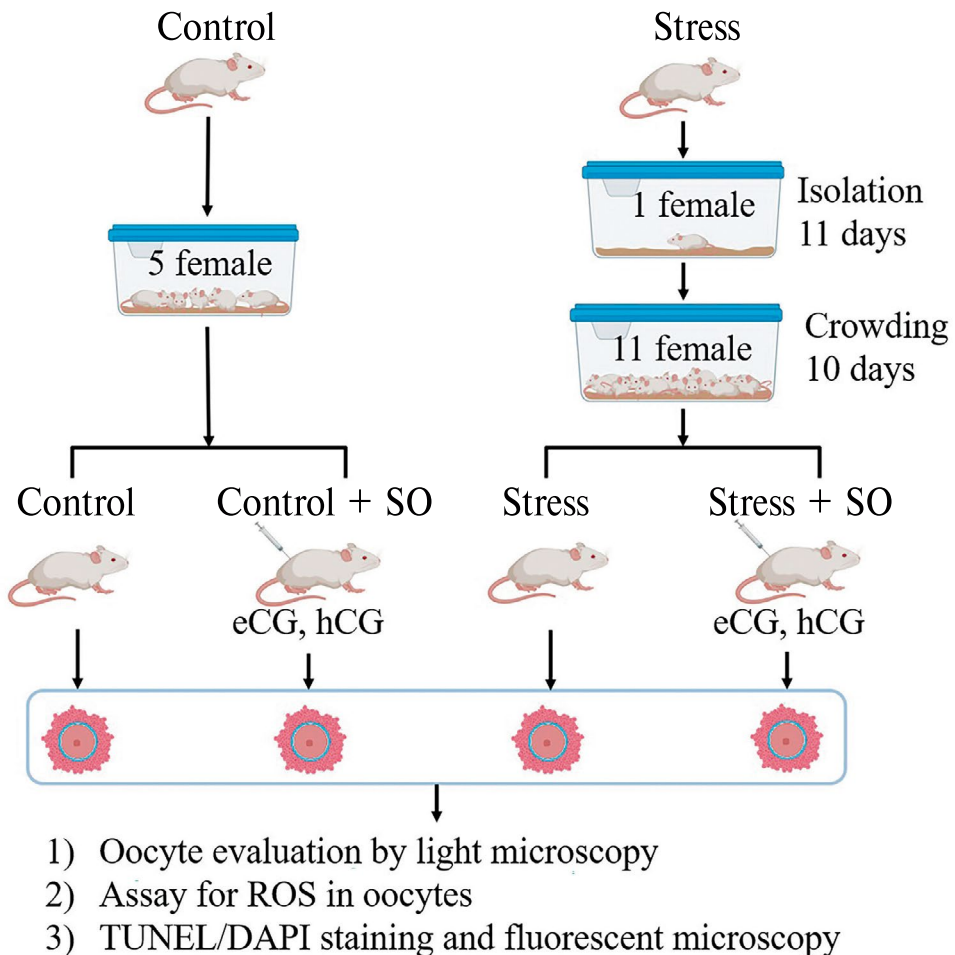


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Группы: Control – интактные самки с естественным эстральным циклом; Control + SO – самки с индуцированной суперовуляцией; Stress – стрессированные самки с естественным эстральным циклом; Stress + SO – стрессированные самки с индуцированной суперовуляцией.

Получение кумулюс-ооцитных комплексов

Кумулюс-ооцитные комплексы (КОК) собирали из ампулярных отделов яйцеводов. У самок с индуцированной суперовуляцией (группы Контроль + СО и Стресс + СО) выделение КОК проводили через 16–17 ч после инъекции ХГЧ. Самки с естественным эстральным циклом (группы Контроль и Стресс) на стадии эструса были ссажены с вазэктомированными самцами на ночь, утром следующего дня у самок, имеющих вагинальные пробки после спаривания, выделяли КОК из ампул яйцеводов. Выделенные КОК анализировали с помощью стереомикроскопа S80 APO (Leica, Германия). После микроскопического анализа был изучен уровень активных форм кислорода (АФК) в ооцитах и число апоптотических клеток в КОК, как описано ниже.

Накопление АФК в ооцитах

Для исследования накопления АФК в ооцитах проводили окрашивание 10 мкМ 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетатом (H2DCFDA, Lumiprobe, Россия), растворенным в среде НТФ при 38 °С в условиях CO₂-инкубатора в течение 30 мин. После инкубации ооциты были трижды промыты в среде FertiCult Flushing medium (FertiPro, Бельгия), а затем перенесены в чистые капли этой среды на стекла с лунками (Микромед, Россия) и покрыты покровным стеклом. Проникающий в клетки H2DCFDA, после отщепления ацетильных групп внутриклеточными эстеразами, флуоресцирует в зеленой области спектра при облучении зеленым светом (максимум поглощения при 511 нм). Интенсивность флуоресценции ооцитов после воздействия H2DCFDA была измерена с использованием микроскопа ZEISS Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 488 нм. Уровни АФК в ооцитах оценивали количественно путем определения интенсивности флуоресценции в цитоплазме ооцитов с помощью программы ImageJ, как описано ранее [28].

Окрашивание TUNEL и DAPI

Исследование апоптоза в кумулюсных клетках производили при помощи набора TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) FITC Apoptosis Detection Kit (Vazyme, Китай), согласно протоколу производителя. КОК фиксировали на адгезивном стекле, после чего трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФБС), а затем обрабатывали протеиназой К в течение 12 мин при комнатной температуре с целью повышения проницаемости мембран. После трех промываний в ФБС с дальнейшим инкубированием в буфере для уравнивания в течение 15 мин, КОК подвергали воздействию раствора TUNEL в течение одного часа при 37 °С. Затем КОК трижды промывали ФБС перед добавлением флуорохрома DAPI. Кроме того, осуществляли позитивный контроль (воздействие на ооциты ДНКазы в течение 10 мин перед окрашиванием TUNEL) и негативный контроль (инкубация в растворе TUNEL, приготовленного без добавления рекомбинантного TdT энзима). Анализ проводили с помощью микроскопа AxioImager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами, подходящими для DAPI и FITC. Подсчет общего числа ядер и апоптотических клеток кумулюса производили путем визуальной оценки препаратов с использованием программы ImageJ, как описано ранее [29].

Статистика

Для статистического анализа использовали стандартный пакет программ STATISTICA v. 8.0 StatSoft Inc. Учитывая отсутствие нормального распределения по Колмогорову-Смирнову, данные по накоплению АФК и числу апоптотических клеток в КОК были проанализированы с использованием критерия Краскела-Уоллеса и затем представлены в виде медианы и 25–75% квартилей, максимального и минимального выборочного значения. Данные по числу ооцитов, а также по проценту зрелых и незрелых ооцитов имели нормальное распределение по Колмогорову-Смирнову и были проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Фишера LSD. Данные по проценту деградирующих ооцитов имели ненормальное распределение и были проанализированы с использованием критерия Краскел-Уоллеса. Данные по уровню кортикостерона в крови имели нормальное распределение и были проанализированы с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия при значении $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность применяемой процедуры для вызывания стрессовой реакции была подтверждена посредством определения уровня кортикостерона в сыворотке крови.

У самок мышей, подвергнутых стрессу, наблюдался повышенный уровень кортикостерона ($p < 0.01$) в крови по сравнению с интактными самками контрольной группы (табл. 1).

Хронический психосоциальный стресс не оказывал влияния на число овулированных ооцитов ($F_{(1, 43)} < 1$). В то же время воздействие на самку гонадотропными гормонами с целью вызвать суперовуляцию достоверно повышало число овулированных ооцитов ($F_{(1, 43)} = 72.1, p < 0.05$), как в контрольных группах (соответственно: 13.0 ± 0.7 без стимуляции и 38.0 ± 3.8 после стимуляции, $p < 0.001$), так и в стрессовых группах (соответственно: 13.4 ± 0.5 без стимуляции и 35.7 ± 3.9 после стимуляции, $p < 0.001$).

Таблица 1. Уровень кортикостерона в крови у интактных и подвергнутых стрессу самок

Группа (число животных)	Кортикостерон (нг/мл)
Контроль ($n = 12$)	246.4 ± 52.5
Стресс ($n = 16$)	$449.8 \pm 42.8^{**}$

Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего. $^{**} p < 0.01$ по сравнению с группой контроль.

Хронический психосоциальный стресс оказывал статистически значимое влияние на созревание ооцитов ($F_{(2, 42)} = 3.3, p < 0.05$), при этом влияние стимулирования суперовуляции было лишь на уровне тенденции ($F_{(2, 42)} = 3.1, p = 0.057$). Статистически значимых различий в проценте деградирующих ооцитов между исследуемыми группами не выявлено ($H(3, N = 47) = 7.04, p > 0.05$). У самок мышей, подвергнутых хроническому психосоциальному стрессу, наблюдался сниженный процент зрелых ооцитов с полярным телом как при естественном цикле ($p < 0.05$), так и после стимулирования яичников гонадотропинами ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2). При введении гонадотропинов с целью суперовуляции у самок контрольной группы процент незрелых форм ооцитов возрастал ($p < 0.05$). У стрессированных самок суперовуляторное воздействие гонадотропинами не оказывало влияние на долю зрелых и незрелых ооцитов. Кроме того, после гормональной стимуляции наблюдали случаи партеногенеза, причем в группе Стресс + СО данное явление встречалось реже ($p < 0.05$), чем в группе Контроль + СО (1.1% и 3.9% соответственно).

В результате окрашивания 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетатом было выявлено повышенное накопление АФК в цитоплазме ооцитов при стрессе ($p < 0.001$, рис. 3).

Гормональная стимуляция суперовуляции снижала уровень накопления АФК в ооцитах у стрессированных самок до уровня контрольных самок. У нестрессированных животных уровни накопления АФК в ооцитах как при гонадотропной стимуляции яичников, так и при естественном эстральном цикле не различались.

Исследование с применением красителя TUNEL и последующей флуоресцентной микроскопией выявило возрастание числа апоптотических клеток в КОК самок мышей, подвергнутых стрессу ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

Гормональная стимуляция суперовуляции снижала число апоптотических клеток кумулюса у стрессированных самок до уровня контрольных. Число апоптотических клеток в кумулюсе у самок мышей из контрольных групп как при стимуляции овуляции, так и при естественном эстральном цикле не различались.

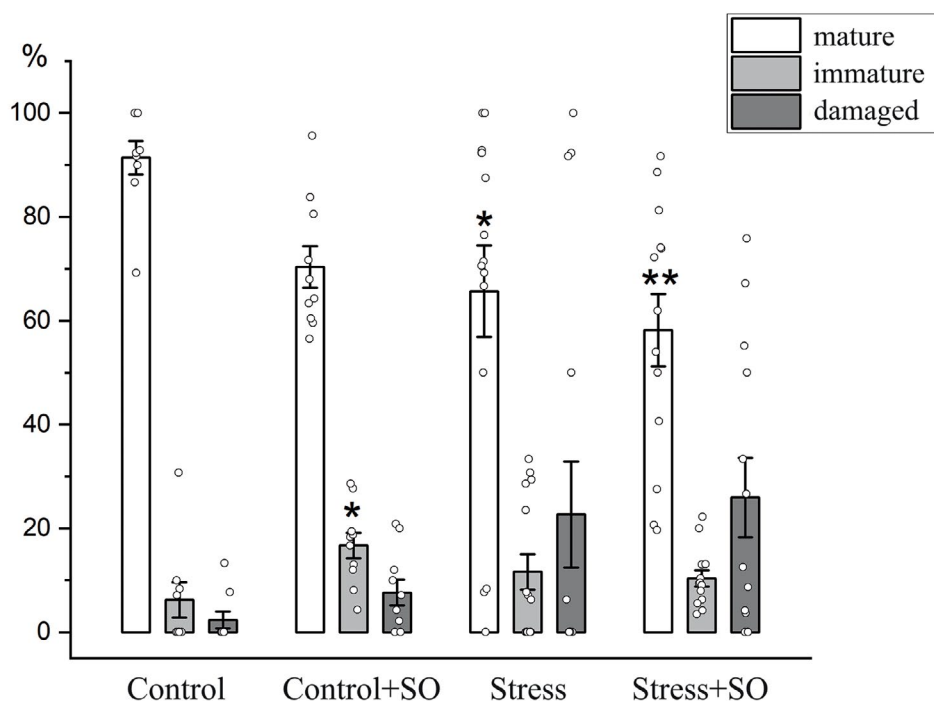


Рис. 2. Характеристики ооцитов у интактных и подвергнутых стрессу самок.

Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с группой Контроль. Число самок/общее число ооцитов в группах Контроль (Control) – 9/117, Контроль + СО (Control + SO) – 10/380, Стресс (Stress) – 15/201, Стресс + СО (Stress + SO) – 13/464.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании самки мышей были подвергнуты хроническому психосоциальному стрессу, а именно: изоляции с последующим содержанием в скученных условиях по ранее описанному протоколу, который был разработан по отношению к самцам крыс [25]. У самок мышей, подвергнутых стрессу, был повышен уровень кортикостерона, который является маркером стрессовой реакции, что верифицирует выбранную модель стресса применительно к самкам мышей.

Хронический психосоциальный стресс не оказывал влияние на общее число овулированных ооцитов у самок мышей при естественном цикле. Для стимуляции яичников мы использовали стандартную схему, а именно последовательное введение 5–10 МЕ ГСЖК в сочетании с введением 5 МЕ ХГЧ через 46–48 ч [17]. Наше исследование показало, что гормональная стимуляция с использованием данной схемы гонадотропного воздействия приводит к получению большего числа ооцитов. При этом число ооцитов у самок, подвергнутых стрессу, было сопоставимо с контролем. Полученные нами результаты согласуются с исследованиями Tsuji с соавт. [30], которые показали, что хронический рестрикционный стресс не влияет на число ооцитов после гормональной стимуляции яичников. Тем не менее в некоторых работах показано, что хронический непредсказуемый стресс может снижать число овулированных ооцитов мышей при

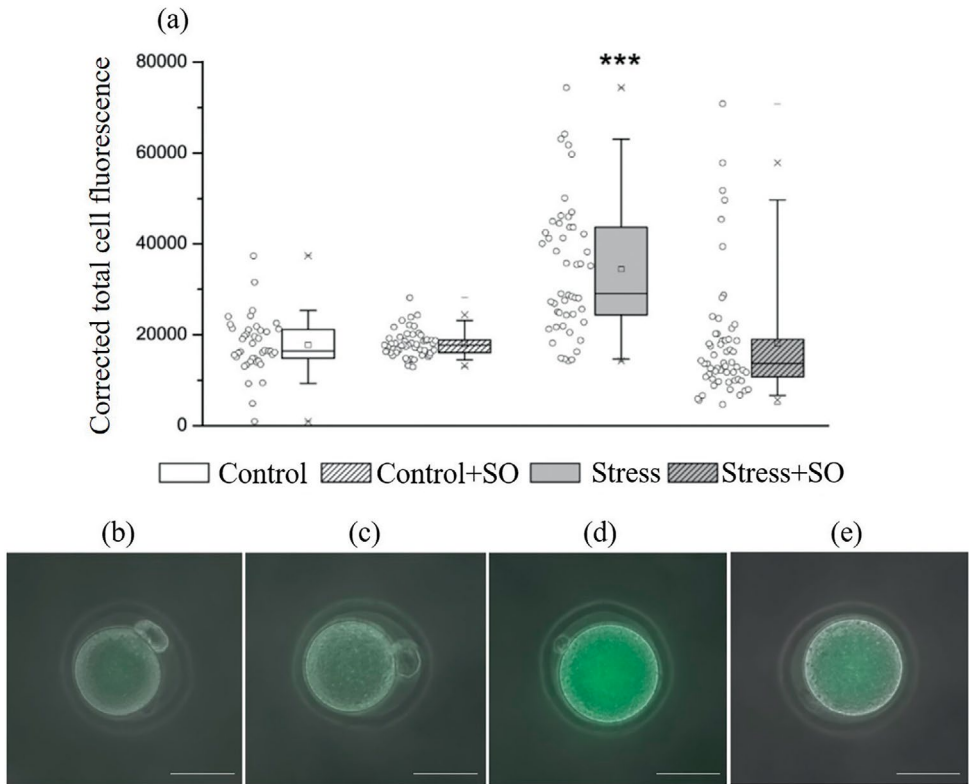


Рис. 3. Уровни накопления активных форм кислорода в цитоплазме ооцитов у интактных и стрессированных самок.

(a) – интенсивность флуоресценции; (b - d) – репрезентативные изображения ооцитов, окрашенных 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетатом: (b) – Контроль, (c) – Контроль + CO, (d) - Стресс, (e) – Стресс + CO. Шкала = 50 мкм. Данные представлены как медиана и 25 - 75% квантили. *** $p < 0.001$ по сравнению с группой Контроль (Control).

применении гонадотропной стимуляции [31]. Эти противоречия могут быть связаны с длительностью и тяжестью воздействия стрессирующих факторов, которые различаются в разных моделях стресса [22, 23].

Наше исследование показывает, что при сравнимом с интактными самками числе овулирующих ооцитов, хронический психосоциальный стресс приводит к ухудшению их качества. Процент зрелых ооцитов на стадии МП был снижен при стрессе, как при естественном цикле, так и после гормональной стимуляции яичников. Наши результаты соответствуют выводам предыдущих исследований [19, 32, 33]. Ранее было показано, что после стрессового воздействия овулированные ооциты находились на стадии герминального везикула (GV), либо на стадии МП, то есть отставали в своем мейотическом созревании [19]. Стресс может приводить к нарушению процесса мейоза в ооцитах [32, 33]. Было установлено, что стресс сопровождается нарушением связей между ооцитом и клетками кумулюса [33], а также вызывает аномалии веретена деления в ооцитах на стадии метафаза II и задержку перехода ооцитов в фазу метафаза I [32], что в конечном итоге выражается в возрастании доли разрушенных и незрелых ооцитов.

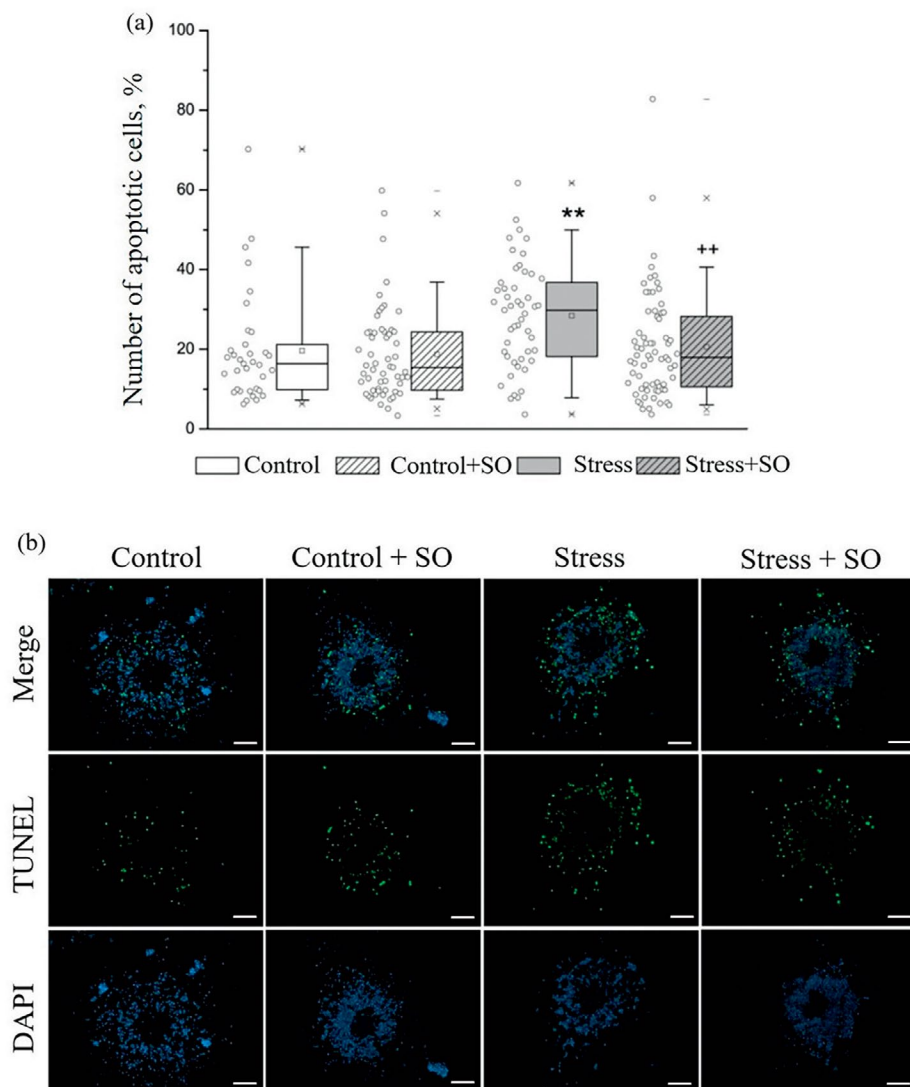


Рис. 4. Уровень апоптоза в кумулюсных клетках у стрессированных самок и самок, не подвергавшихся стрессу. (a) – процент апоптотических клеток в КОК; (b) – репрезентативные изображения ооцитов, окрашенных TUNEL/DAPI. Шкала = 50 мкм. Данные представлены как медиана и 25 – 75% квантили. ** $p < 0.01$ по сравнению с группой Контроль (Control); ++ $p < 0.01$ по сравнению с группой Стресс (Stress).

Ранее было установлено, что чем тяжелее и продолжительнее стресс, тем в большей мере он отражается на развитии ооцитов мышей [23]. Длительный стресс может приводить к существенному истощению интраовариального резерва фолликулов, это касается как примордиальных и первичных, так и вторичных фолликулов [34].

Согласно нашим данным, гонадотропная стимуляция яичников приводила к увеличению доли незрелых ооцитов у контрольных самок мышей. При этом на фоне стрес-

са качество овулированных ооцитов после гормональной стимуляции не изменялось, и в целом было ниже по сравнению с интактным контролем. Существуют исследования, показывающие снижение процента зрелых ооцитов, а также повышение числа атретических фолликулов при гонадотропной стимуляции яичников мышей в сравнении с естественной овуляцией [35, 36]. В нескольких исследованиях выявлено изменение морфологии в ооцитах, полученных в результате применения экзогенных гонадотропинов [35, 37, 38]. В частности, в ооцитах, полученных после суперовуляции, обнаружено снижение активности митохондрий и больший процент деформированных митохондрий [35], утончение прозрачной оболочки и уменьшение размера ооцита [37, 38], а также ряд других ультраструктурных аномалий. Этот специфический фенотип ооцитов и полученных из них эмбрионов сопряжен с изменением экспрессии не менее 92 генов в сравнении с естественно овулированными ооцитами [37, 38].

В нашем исследовании показано, что хронический психосоциальный стресс приводит к повышенному накоплению АФК в ооцитах у самок мышей. С одной стороны, АФК играют важную роль в регуляции овариального цикла, разрыве фолликула, поддержании желтого тела и его регрессии [39]. С другой стороны, чрезмерное накопление АФК провоцирует окислительные процессы, которые могут сопровождаться блокированием мейоза [4]. При этом происходит преждевременный разрыв связей ооцита с кумулюсными клетками, что препятствует поступлению необходимых питательных веществ и ростовых факторов к ооциту и в конечном итоге приводит к апоптозу [4]. Неблагоприятные факторы, в том числе стресс, могут вызывать повышенную выработку АФК [9]. Чрезмерное накопление АФК может быть одним из факторов, снижающих качество овулирующих ооцитов при стрессе, что мы наблюдали в настоящем исследовании.

Результаты нашей работы показывают, что применение гонадотропинов для стимуляции яичников не оказывает влияния на уровень накопления АФК в ооцитах контрольных нестрессированных самок мышей. В то же время стимуляция яичников гонадотропинами на фоне стресса нивелирует повышенный уровень накопления АФК, наблюдаемый при естественной овуляции, возвращая тем самым окислительный статус ооцитов в состояние аналогичное контролю. Данные по влиянию гонадотропинов на уровень накопления АФК противоречивы, что может быть связано с различиями в протоколах исследований [40, 41]. В работе Guo с соавт. [42] показано, что у самок, подвергнутых хроническому рестрикционному стрессу с последующей стимуляцией яичников гонадотропинами, происходит чрезмерное накопление АФК в ооцитах по сравнению с контролем. В нашем исследовании уровень накопления АФК в ооцитах стрессированных и нестрессированных самок мышей после введения гонадотропинов не отличался. Эти различия в результатах исследований могут быть объяснены разной интенсивностью стрессовой реакции; в нашем исследовании использовался более мягкий стрессовый стимул, который не приводил к столь сильному повреждению ооцитов.

Стоит отметить, что для исследования уровня АФК также важен «возраст» ооцита [43], а именно, сколько времени прошло после гормональной стимуляции яичников, а также состояние антиоксидантной системы [44]. Chen с соавт. [43] показали, что ооциты, полученные от стрессированных самок после 19 ч с момента введения ХГЧ, имеют повышенный уровень АФК по сравнению с нестрессированными самками, тогда как до этого срока различий не наблюдалось. Наши результаты по уровню АФК были получены на ооцитах, выделенных после 16 ч с момента введения ХГЧ, и в целом не противоречат результатам Chen с соавт. [43]. Кроме того, мы наблюдали некоторый положительный эффект от гонадотропной стимуляции яичников на уровень накопления АФК при стрессе, а именно, нормализацию АФК до уровня нестрессированных самок. Механизмы, лежащие в основе обнаруженного эффекта, требуют дальнейшего изучения.

В нашем исследовании показано, что психосоциальный стресс приводит к увеличению уровня апоптоза в кумулюсных клетках ооцитов при естественном цикле. При этом стимуляция яичников гонадотропинами на фоне стресса снижала число клеток, подвергнутых апоптозу до уровня контрольных самок. Данные литературы о влиянии психосоциального стресса на апоптоз в КОК на фоне естественного овариального цикла отсутствуют. Во всех известных нам работах, направленных на изучение апоптоза в кумулюсных клетках, для получения КОК используют суперовуляторные схемы с применением экзогенных гонадотропинов, и влияние фактора стимуляции яичников гонадотропинами не рассматривают отдельно от стрессового воздействия. В работах на мышах с использованием модели рестрикционного стресса с применением ГСЖК с целью стимуляции яичников было показано, что стресс приводит к увеличению апоптоза в кумулюсных и в пристеночных гранулезных клетках, что ухудшает потенциал развития ооцитов [45, 46]. Моделирование стресса путем введения мышам кортизола через 24 ч после введения ГСЖК также способствует увеличению апоптоза в кумулюсных клетках [47]. Однако в нашем исследовании психосоциальный стресс, вызванный содержанием животных в изоляции с последующим помещением в условия скученности в сочетании с введением гонадотропинов, не приводил к увеличению апоптоза в клетках кумулюса, что может быть связано с выбранной моделью стрессового воздействия, а также особенностями схемы гормональной стимуляции яичников.

Нами впервые было обнаружено снижение уровня апоптоза в КОК, полученных из яичников стрессированных животных, при применении схемы гонадотропной стимуляции яичников. Механизм такого «защитного» действия гонадотропных гормонов может быть связан с их стимулирующим действием на яичники, что может запускать антистрессовые механизмы [48]. Известно, в частности, что воздействие гонадотропными гормонами приводит к повышению концентрации эстрадиола и прогестерона в крови у человека и животных, хотя этот эффект зависит от вида млекопитающих, дозировки вводимого препарата гонадотропина и индивидуальной чувствительности [49, 50]. Эстрогены, в свою очередь, вызывают повышение уровня кортикостероидсвязывающего глобулина, тем самым уменьшая количество свободного кортикостерона, доступного в тканях-мишенях [48], что и может объяснить протективный эффект гонадотропной стимуляции, наблюдавшийся в наших экспериментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что психосоциальный стресс ухудшает качественный состав ооцитов, снижая процент зрелых форм, а также приводит к накоплению АФК в ооцитах и возрастанию апоптоза в кумулюсных клетках. Стимуляция стрессированных самок гонадотропинами приводила к снижению накопления АФК и числа апоптотических клеток в кумулюс-ооцитных комплексах до уровня нестрессированных самок. Таким образом, гормональная стимуляция яичников способна снизить вызванный стрессом окислительный стресс в клетках кумулюс-ооцитных комплексов и тем самым улучшить качество ооцитов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Авторы Т. Н. И., Д. А. Л. и С. Я. А.), сбор данных (Д. А. Л., Т. Н. И., Н. А. Ш.), обработка данных (Д. А. Л., Ш. Н. А.), написание и редактирование манускрипта (Д. А. Л., Е. Ю. Б., Т. Н. И. и С. Я. А.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 23–25–00139). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 143 от 15.03.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox C., Thoma ME, Tchangelova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL, Kiarie J (2022) Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduct Open* 2022(4). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
2. Тювина НА, Николаевская АО (2019) Бесплодие и психические расстройства у женщин. сообщение 2. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика* 11(4): 117–124. [Тювина НА, Николаевская АО (2019) Infertility and mental disorders in women. Communication 1. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics* 11(4): 117–124. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2019-4-117-124>
3. Левинсон АЛ, Игонина ТН, Рожкова ИН, Брусенцев ЕЮ, Амстиславский СЯ (2022) Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные. *Вавилов журн генетики и селекции* 26(5): 431–441. [Levinson AL, Igonina TN, Rozhkova IN, Brusentsev EYu, Amstislavsky SYa (2022) Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data. *Vavilov J Genetics and Breeding* 26(5): 431–441. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-53>
4. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK (2016) Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *J Biomed Sci* 23: 36. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0253-4>
5. Zhou FJ, Cai YN, Dong YZ (2019) Stress increases the risk of pregnancy failure in couples undergoing IVF. *Stress* 22(4): 414–420. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1584181>
6. Zhang SY, Wang JZ, Li JJ, Wei DL, Sui HS, Zhang ZH, Zhou P, Tan JH (2011) Maternal Restraint Stress Diminishes the Developmental Potential of Oocytes. *Biol Reproduct* 84(4): 672–681. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087890>
7. Zhao X, Ma R, Zhang X, Cheng R, Jiang N, Guo M, Rong B, Liu Y, Chen M, Feng W, Xia T (2021) Reduced growth capacity of preimplantation mouse embryos in chronic unpredictable stress model. *Mol Reproduct Development* 88(1): 80–95. <https://doi.org/10.1002/mrd.23439>
8. Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP (2004) Stress and the female reproductive system. *J Reprod Immunol* 62(1–2): 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2003.09.004>
9. Zhai QY, Wang JJ, Tian Y, Liu X, Song Z (2020) Review of psychological stress on oocyte and early embryonic development in female mice. *Reproduct Biol Endocrinol* 18(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00657-1>
10. Joseph D, Whirledge S (2017) Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *Int J Mol Sci* 18(10): 2224. <https://doi.org/10.3390/ijms18102224>
11. Michael TE, Pester LA, Curtis P, Shaw RW, Edwards CRW, Cooke BA (1993) Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin Endocrinol* 38(6): 641–644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1993.tb02147.x>
12. Tsutsui K, Ubuka T, Son YL, Bentley GE, Kriegsfeld LJ (2015) Contribution of GnIH Research to the Progress of Reproductive Neuroendocrinology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 179. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00179>
13. Abdullah KAL, Atazhanova T, Chavez-Badiola A, Shivhare SB (2023) Automation in ART: Paving the Way for the Future of Infertility Treatment. *Reprod Sci* 30(4): 1006–1016. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00941-y>

14. *Ebbesen SM, Zachariae R, Mehlsen MY, Thomsen D, Højgaard A, Einarsson S, Brandt Y, Lundeheim N, Madej A* (2008) Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Veter Scand* 50(1): 48.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-48>
15. *Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D'Hooghe T, Sunkara SK* (2019) The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 429.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>
16. *Lispi M, Humaidan P, Bousfield GR, D'Hooghe T, Ulloa-Aguirre A* (2023) Follicle-Stimulating Hormone Biological Products: Does Potency Predict Clinical Efficacy? *Int J Mol Sci* 24(10): 9020.
<https://doi.org/10.3390/ijms24109020>
17. *Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A* (2018) Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harb Protoc* 2018(1).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403>. PMID: 29295897
18. *Mochida K* (2020) Development of assisted reproductive technologies in small animal species for their efficient preservation and production. *J Reprod Dev* 66(4): 299–306.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2020-033>
19. *Kala M., Nivsarkar M* (2016) Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. *Gener Compar Endocrinol* 225: 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.010>
20. *Mariotti FFN, Gonçalves BSM, Pimpão G, Mônico-Neto M, Antunes HKM, Viana MB, Céspedes IC, Le Sueur-Maluf L* (2020) A single ovarian stimulation, as performed in assisted reproductive technologies, can modulate the anxiety-like behavior and neuronal activation in stress-related brain areas in rats. *Horm Behav* 124: 104805.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104805>
21. *Louis GM, Lum KJ, Sundaram R, Chen Z, Kim S, Lynch CD, Schisterman EF, Pyper C* (2011) Stress reduces conception probabilities across the fertile window: evidence in support of relaxation. *Fertil Steril* 95(7): 2184–2189.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.078>
22. *Retana-Márquez S, Juárez-Rojas L, Ávila-Quintero A, Rojas-Maya S, Perera G, Casillas F* (2020) Neuroendocrine disruption is associated to infertility in chronically stressed female rats. *Reprod Biol* 20(4): 474–483.
<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.011>
23. *Gao Y, Chen F, Kong QQ, Ning SF, Yuan HJ, Lian HY, Luo MJ, Tan JH* (2016) Stresses on Female Mice Impair Oocyte Developmental Potential: Effects of Stress Severity and Duration on Oocytes at the Growing Follicle Stage. *Reprod Sci* 23(9): 1148–1157.
<https://doi.org/10.1177/1933719116630416>
24. *Kim J, You S* (2022) High Housing Density-Induced Chronic Stress Diminishes Ovarian Reserve via Granulosa Cell Apoptosis by Angiotensin II Overexpression in Mice. *Int J Mol Sci* 23(15): 8614.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158614>
25. *Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Bugajski A, Bugajski J* (2019) Chronic Isolation Stress Affects Subsequent Crowding Stress-Induced Brain Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoforms and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Responses. *Neurotox Res* 36(3): 523–539.
<https://doi.org/10.1007/s12640-019-00067-1>
26. *Caligioni CS* (2009) Assessing Reproductive Status/Stages In Mice. *Curr Protoc Neurosci* 48(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
27. *Shindo M, Miyado K, Kang W, Fukami M, Miyado M* (2022) Efficient Superovulation and Egg Collection from Mice. *Bio Protoc* 12(11): e4439.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4439>
28. *Sabry R, Nguyen M, Younes S, Favetta LA* (2022) BPA and its analogs increase oxidative stress levels in in vitro cultured granulosa cells by altering anti-oxidant enzymes expression. *Mol Cell Endocrinol* 545: 111574.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111574>
29. *Mirzayans R, Murray D* (2020) Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci* 21(23): 9090.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239090>
30. *Tsuji A, Ikeda Y, Murakami M, Kitagishi Y, Matsuda S* (2021) Leucine protects oocytes from chronic psychological stress in mice. *Reprod Med Biol* 20(4): 477–484.
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12396>
31. *Wu LM, Hu MH, Tong XH, Han H, Shen N, Jin RT, Wang W, Zhou GX, He GP, Liu YS* (2012) Chronic Unpredictable Stress Decreases Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Mouse Ovaries: Relationship to Oocytes Developmental Potential. *PLoS One* 7(12): e52331.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052331>

32. Sun J, Guo Y, Zhang Q, Bu S, Li B, Wang Q, Lai D (2018) Chronic restraint stress disturbs meiotic resumption through APC/C-mediated cyclin B1 excessive degradation in mouse oocytes. *Cell Cycle* 17(13): 1591–1601.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1471316>
33. Casillas F, Flores-González A, Juárez-Rojas L, López A, Betancourt M, Casas E, Bahena I, Bonillac E (2023) Chronic stress decreases fertility parameters in female rats. *Systems Biol in Reprod Med* 69(3): 234–244.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2023.2171822>
34. Gao L, Zhao F, Zhang Y, Wang W, Cao Q (2020) Diminished ovarian reserve induced by chronic unpredictable stress in C57BL/6 mice. *Gynecol Endocrinol* 36(1): 49–54.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1631274>
35. Lee M, Ahn JI, Lee AR, Ko DW, Yang WS, Lee G, Ah JY, Lim JM (2017) Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes. *Molec and Cells* 40(8): 558–566.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0058>
36. Wang Q, Zhao SX, He JN, Zhao H, Gu BX, Xie JK, Zhao YJ, Zhang CL, Ge ZJ (2022) Repeated Superovulation Accelerates Primordial Follicle Activation and Atresia. *Cells* 12(1): 92.
<https://doi.org/10.3390/cells12010092>
37. Zhang X, Wang L, Li X, Li K, Fang J, Yao Y (2010) Ovarian stimulation retards postimplantation development and alters global gene expression profile of blastocysts in mouse. *Fertil Steril* 93(8): 2770–2773.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.018>
38. Taher L, Israel S, Drexler HCA, Makalowski W, Suzuki Y, Fuellen G, Boiani M (2021) The proteome, not the transcriptome, predicts that oocyte superovulation affects embryonic phenotypes in mice. *Sci Rep* 11(1): 23731.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03054-9>
39. Liang J, Gao Y, Feng Z, Zhang B, Na Z, Li D (2023) Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. *Redox Biol* 62: 102659.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102659>
40. Hoque SAM, Umehara T, Kawai T, Shimada M (2021) Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries. *Free Radic Biol Med* 163: 344–355.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.434>
41. Gong X, Shen L, Zhang H, Ai J, Gilchrist RB, Zhao Y (2023) CAPA-IVM improves the cytoplasmic quality of in vitro-matured oocytes from unstimulated mice. *Theriogenology* 212: 117–128.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.004>
42. Guo Y, Sun J, Bu S, Li B, Zhang Q, Wang Q, Lai D (2020) Melatonin protects against chronic stress-induced oxidative meiotic defects in mice MII oocytes by regulating SIRT1. *Cell Cycle* 19(13): 1677–1695.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1767403>
43. Chen RR, Wang J, Zhang M, Kong QQ, Sun GY, Jin CH, Luo MJ, Tan JH (2022) Restraint stress of female mice during oocyte development facilitates oocyte postovulatory aging. *Aging (Albany NY)* 14(22): 9186–9199.
<https://doi.org/10.18632/aging.204400>
44. Sun J, Guo Y, Fan Y, Wang Q, Zhang Q, Lai D (2021) Decreased expression of IDH1 by chronic unpredictable stress suppresses proliferation and accelerates senescence of granulosa cells through ROS activated MAPK signaling pathways. *Free Radic Biol Med* 169: 122–136.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.016>
45. Liang B, Wei DL, Cheng YN, Yuan HJ, Lin J, Cui XZ, Luo MJ, Tan JH (2013) Restraint stress impairs oocyte developmental potential in mice: role of CRH-induced apoptosis of ovarian cells. *Biol Reprod* 89(3): 64.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110619>
46. Li CY, Li ZB, Kong QQ, Han X, Xiao B, Li X, Chang ZL, Tan JH (2018) Restraint-induced corticotrophin-releasing hormone elevation triggers apoptosis of ovarian cells and impairs oocyte competence via activation of the Fas/FasL system. *Biol Reprod* 99(4): 828–837.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox091>
47. Yuan HJ, Han X, He N, Wang GL, Gong S, Lin J, Gao M, Tan JH (2016) Glucocorticoids impair oocyte developmental potential by triggering apoptosis of ovarian cells via activating the Fas system. *Sci Rep* 6: 24036.
<https://doi.org/10.1038/srep24036>
48. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B (2016) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* 6: 603–621.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>

49. Miller BG, Armstrong DT (1981) Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. *Biol Reprod* 25: 261–271.
[https://doi: 10.1095/biolreprod25.2.261](https://doi.org/10.1095/biolreprod25.2.261)
50. Fayazi M, Beigi Boroujeni M, Salehnia M, Khansarinejad B (2014) Ovarian stimulation by exogenous gonadotropin decreases the implantation rate and expression of mouse blastocysts integrins. *Iran Biomed J* 18(1): 8–15.
[https://doi: 10.6091/ibj.1236.2013](https://doi.org/10.6091/ibj.1236.2013)

EFFECTS OF OVARIAN STIMULATION WITH GONADOTROPINS IN THE CONDITIONS OF CHRONIC PSYCHOSOCIAL STRESS ON THE QUALITY OF MURINE OOCYTE

D.A. Lebedeva^a, T.N. Igonina^{a,*}, E. Yu. Brusentsev^a, N.A. Shavshaeva^{a,b}, and S. Ya. Amstislavsky^a

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

**e-mail: egik_00@mail.ru*

Chronic psychosocial stress may negatively affect the female reproductive system. Meanwhile, the effect of ovarian stimulation with gonadotropins during stress on the quality of oocytes remains poorly studied. The purpose of this work was to investigate the effects of chronic psychosocial stress on the quality of murine cumulus-oocyte complexes during natural estrus cycle, as well as during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins; the latter is an important part of modern assisted reproductive technologies. The results of the study demonstrate that psychosocial stress does not affect the number of ovulating oocytes, but worsens their quality, i. e. reduces the percentage of mature oocytes. In addition, stressed mice exhibited the increased accumulation of reactive oxygen species in oocytes, which is accompanied by the enhanced rate of apoptosis in cumulus cells. Hormonal stimulation of the ovaries with gonadotropins alleviates the negative changes associated with the psychosocial stress, normalizing the level of reactive oxygen species in oocytes and reducing the rate of apoptosis in cumulus cells.

Keywords: chronic psychosocial stress, gonadotropins, cumulus-oocyte complexes, oxidative stress, apoptosis, mice