

МОДУЛЯЦІЯ ІНДУКОВАНИХ ГОНАДОТРОПІНОМ СТЕРОЇДОГЕННИХ ФЕРМЕНТІВ В КЛІТИНАХ ГРАНУЛЬОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ D-ХІРО-ІНОЗИТОЛУ*

SANDRO SACCHI

Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

FEDERICA MARINARO

Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

DEBORA TONDELLI

Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

та інші автори

Контакти:

Sandro Sacchi

Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia
Via del pozzo 41
41100 Modena, Italy

ВСТУП І АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

Цис-1, 2, 4-транс-3, 5, 6-циклогексангексаол, також відомий як D-хіро-інозитол (DCI), являє собою шестивуглецевий поліалкоголь, який належить до сім'ї інозитолів, що є частиною сімейства вітамінів групи B. На клітинному рівні інозитолі входять у клітинні мембрани як фосфатидил-інозитолі, попередники інозитолтрифосфату, що діють як другі посередники та регулюють діяльність різних гормонів, таких як фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) та інсулін [1]. Епімеразні ферменти перетворюють інозитолі на дев'ять стереоізомерів, включаючи міо-інозитол (MI) та DCI, тоді як більшість інших стереоізомерів, що генеруються, не можуть продемонструвати явну біологічну активність [2]. MI та DCI є як ендогенними і біосинтезованими, так і такими, що вводяться з дієтичних джерел, наприклад, гречки [3], *Cucurbita ficifolia* (гарбуза) [4] та соєвого лецитину [5].

DCI розглядається як сенсibilізатор інсуліну, оскільки медіатори інозитолфосфоглікану (ІФГ) беруть участь у кількох клітинних функціях, які контролюють обмін глюкози [6, 7].

Крім того, було показано, що знижений метаболізм медіаторів ІФГ, а також дефіцит у тканинах інозитолу викликають резистентність до інсуліну [8, 9].

Оскільки DCI синтезується епімеразою, яка перетворює *in vivo* MI в DCI, в декількох дослідженнях було встановлено, що зниження концентрації DCI в сечі, а також у тканинах людей та тварин із діабетом 2 типу супроводжувалося збільшенням вмісту MI [10, 11].

Додаткові дослідження показали, що змінні моделі екскреції інозитолу в сечі людини та мавпи були пов'язані переважно з інсулінорезистентністю (IP), а не з типом діабету. Щоб пояснити змінну структуру екскреції інозитолу в сечі, що спостерігається під дією IP, було висунуто гіпотезу про дефект процесу епімеризації.

При IP зменшується коефіцієнт конверсії MI у DCI, що призводить до зниження рівня DCI в клітинах.

В 2003 році Європейське товариство репродукції та ембріології людини (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) та Американське товариство репро-

дуктивної медицини (American Society for Reproductive Medicine, ASRM) встановили, що синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) визначається наявністю двох умов із трьох, таких як ановуляція або гіперандрогенія чи збільшення обсягу яєчників. Проте пацієнтки з СПКЯ часто страждають на IP, і було висунуто гіпотезу, що дефіцит DCI, який функціонує як другий посередник в шляху сигналізації інсуліну [12], може бути пов'язаний з IP [13].

Було продемонстровано, що DCI може позитивно впливати на кілька аспектів етіології СПКЯ [8, 14]. У низці досліджень вдалося зменшити загальний і вільний рівень тестостерону, знизити артеріальний тиск за допомогою DCI, який діє як сенсibilізатор інсуліну шляхом поліпшення обміну глюкози, і, нарешті, збільшити частоту овуляції [8, 14, 15].

Було повідомлено, що інсулін здатний взаємодіяти зі стероїдогенними ферментами в гранульозних і в лютеїнових клітинах яєчників [16–20]. Зокрема, інсулін, як вважається, потенціює індукцію ФСГ та лютеїнізуючого гормону (ЛГ), цитохрому P450 сімейства 19 підроддини A1 (CYP19A1), ароматази, і цей ефект виявляється настільки очевидним, що багато хто вважає інсулін ко-гонадотропіном [17–19, 21]. Спільна терапія *in vitro* із інсулін-сенсibilізаторами, такими як метформін або тіазолідіндіон, протидіє потужній дії інсуліну на ферменти клітин гранульози людини (КГЛ), а отже, показує актуальність активності інсуліну для фізіології клітин яєчників [16–21].

Метою даного дослідження було розширення цього аргументу, а отже, дослідження потенційного впливу інсуліну на реакцію яєчників на два гонадотропіни ФСГ та ЛГ. Ми спеціально дослідили модифікації експресії генів двох ключових генів в стероїдогенезі, ароматази CYP19A1 та розщеплення бокових ланцюгів цитохрому P450 (P450_{scc}). Ми також оцінили, чи є DCI сенсibilізатором інсуліну, здатним протидіяти очікуваній активності інсуліну в стимулюванні ферментів КГЛ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Критерії відбору

Відібрані для дослідження пацієнтки (n = 8) були здорові та мали регулярні менструальні цикли. Середній вік пацієнток склав 34 ± 8 років. Пацієнтки пройшли запліднення *in vitro*

* Адаптований переклад. Оригінал статті опублікований в журналі Reproductive Biology and Endocrinology 14:52 (2016), DOI: 10.1186/s12958-016-0189-2

(in vitro fertilization, IVF, або екстракорпоральне запліднення, ЕКЗ) з причини чоловічого безпліддя. Клінічні критерії виключення з дослідження: попередня операція на яєчниках, позитивний показник тестування на антитіла до хламідій (CAT), наявність кіст яєчників, запальні захворювання органів малого таза (ЗЗОМТ) в анамнезі, будь-яке відоме метаболічне або ендокринологічне захворювання. Пацієнтки проходили цикли IVF за протоколом антагоніста гонадотропін-релізінг-гормону (ГнРГ), а також отримували рекомбінантний ФСГ людини (рФСГ, Gonal F®, Merck Serono, Італія або Puregon® MSD Organon, Італія) в дозі щонайменше 150 міжнародних одиниць (МО) на день, підшкірно з 2 або 3 дня спонтанного менструального циклу. Антагоніст ГнРГ, Ganirelix (Orgalutran, Schering-Plough, Швейцарія) або Cetorelix (Cetrotide, Merck Serono, Італія) призначали щодня у вигляді підшкірної ін'єкції (0,25 мг/день) від дня стимуляції, коли перший фолікул досягав розміру 14 мм, до дня введення хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ). Коли фолікули досягали розміру 18 мм та більше, внутрішньом'язово вводили 10000 МО ХГЛ та через 34–36 годин після цього аспірували фолікул пацієнтки під наркозом. КГЛ виділяли з фолікулів яєчників у жінок, після того як були отримані ооцити за протоколом IVF. Дозвіл на дослідження було отримано від місцевого комітету з питань етики, також була отримана письмова згода від кожної пацієнтки.

Виділення гранулозо-лютеїнових клітин та первинної клітинної культури

КГЛ очищували шляхом центрифугування через переривчастий градієнт Percoll (Amersham, Швеція), як зазначено в [22], і культивували індивідуально в 24-лунковій пластині (50x103 клітин/лунка) в середовищі McCoy 5A (Carlo Erba, Італія) з додаванням 5% фетальної бичачої сироватки (ФБС) Південної Америки (затверджена ЕС, Карло Ерба, Італія), 2 мМ L-глутаміну, 1% пеніциліну/стрептоміцину і 1% амфотерицину В (Sigma Aldrich, Сент-Луїс, МО, США). Первинна культура КГЛ знаходилась при 37 °C у контрольованій атмосфері з 5% CO₂ протягом 6 днів, щоб уникнути побічної дії лікування IVF-гормонами та не піддавати впливу змін зовнішнього середовища свіжої клітинної культури.

Обробка культури клітин

Спочатку первинні культури КГЛ інкубували в середовищі голодування (McCoy 5A середовище, доповнене 0,1% ФБС Південної Америки без антибіотиків) протягом 12 годин для синхронізації клітин перед процедурою. Потім КГЛ інкубували протягом 24 годин з 0,1 МО/мл інсуліну тривалої дії (Levemir®, Novo Nordisk, Данія).

Оброблені інсуліном КГЛ додатково інкубували з 20 нМ або 10 нМ DCI (LJ Pharma, Італія) окремо або в комбінації з 5 мкМ рФСГ (Gonal-F®, Merck Serono, Італія) або 5 мкМ рекомбінантного ЛГ людини (рЛГ, Luveris®, Merck Serono, Італія) протягом 24 годин.

DCI та гонадотропіни розчиняли в середовищі голодування. Експерименти повторювали тричі. Були проведені контрольні порівняння оброблених і необроблених клітин,

які не показали будь-яких відмінностей щодо життєздатності клітин, токсичних ефектів або порушення експресії генів, викликаних безпосередньо тією речовиною, в якій були розчинені.

Вибірковий тест на життєздатність клітин із трипановим синім

Для оцінки життєздатності первинних культур КГЛ, що оброблялися гонадотропіном, був проведений тест з фарбуванням трипановим синім (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, США).

КГЛ, що відповідають кожній обробці та контролю, занурювали в 0,4% трипанового синього з додаванням 1X фосфатного буфера Дульбекко з фізіологічним розчином (DPBS, Sigma Aldrich, Сент-Луїс, МО, США) безпосередньо в лунки, після чого негайно підраховували (n = 200) під інверсним мікроскопом PrimoVert (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Німеччина). Відсоток життєздатних клітин розраховували і виражали як співвідношення між мертвими клітинами синього кольору та живими клітинами без кольорів.

Оцінка експресії генів за допомогою аналізу RT-qPCR

Зібрані КГЛ після кожної обробки негайно обробляли для вилучення загальної РНК за допомогою продукту Tri-Reagent® (Sigma Aldrich, Сент-Луїс, МО, США) за протоколом виробника. Після того, як додаткова DNase I (Promega, Madison, WI, USA) перетравлювалась протягом 30 хвилин при 37 °C, екстраговану РНК оцінювали та кількісно визначали методом спектрофотометрії, використовуючи Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) та 2 мкг РНК кожного зразка було зворотньо транскриповано в ДНК за допомогою набору синтезу ДНК iScript™ (Bio-Rad, Геркулес, CA, США) згідно з таблицею нижче. 2 мкл ДНК кожного зразка тестували у трьох примірниках у RT-qPCR, використовуючи SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, США) відповідно до умов, запропонованих у протоколі виробника.

Праймери, використані у реакції RT-qPCR (перераховані в таблиці нижче), були спроектовані, де це можливо, щоб уникнути додавання забруднюючих речовин до ДНК. Усі використовувані праймери мають аналогічну температуру плавлення, тому загальний тепловий профіль реакції для всіх генів був таким: для активації досліджуваних ферментів – 30 с при 95 °C, потім 40 циклів при 95 °C протягом 5 с та 60 °C протягом 20 с для кожного циклу. Результати упорядковувались за допомогою еталонного гена Ribosomal protein S7 (RpS7). Специфічність кожного аналізу була підтверджена аналізом кривої дисоціації, й амплікони розділяли методом гель-електрофорезу та зображення. Результати тестів були перевірені шляхом оцінки ефективності підсилення за допомогою калібрувальних кривих та відмічені діаграмою вхідного значення, що має нахил, в порівнянні з DCq (також відомий як DCT). Кожну реакцію повторили тричі. Негативні контрольні реакції не включені до шаблонів.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводився з використанням t-кофіцієнта Ст'юдента (p < 0,05), встановленого для стати-

МІЖДИСЦИПЛІНАРНІ ПРОБЛЕМИ

стичної значущості. Відносну експресію кожного гена оцінювали за допомогою методу 2- $\Delta\Delta C_t$ [23] і обчислювали як співвідношення в порівнянні з першим контрольним зразком, прийнятим довільно за 1.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Щоб дослідити можливу роль DCI як модулятора експресії генів, первинну культуру КГЛ обробляли протягом 24 годин при збільшеній концентрації DCI, розчиненого в середовищі голодування. Для оцінки життєздатності клітин наприкінці оброблення DCI було проведено тест з фарбуванням трипановим синім, при тому активація гену $\beta 3$ інтегрину, виражена як коефіцієнт, нормований RpS7-еталонним геном при аналізі RT-qPCR, вивчалася як позитивний контроль (рис. 1).

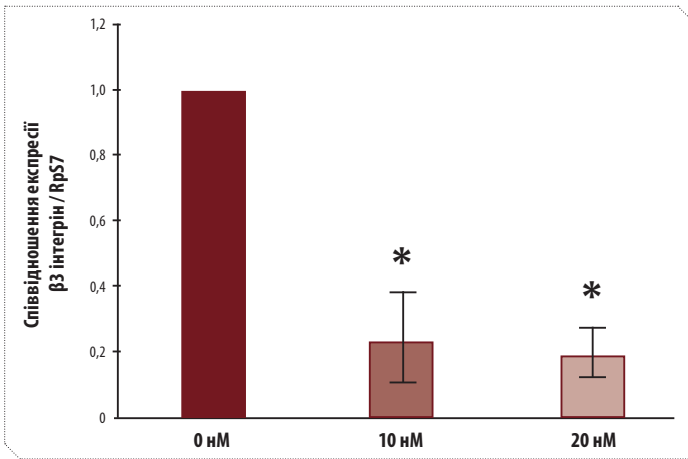


Рисунок 1. Вплив 24-годинної інкубації з підвищенням дози DCI на експресію гена $\beta 3$ інтегрину, нормалізованого еталонним геном RpS7 у первинній культурі КГЛ *in vitro* за допомогою RT-qPCR

* відмінності у порівнянні з відповідними елементами контролю, $p < 0,05$

За всіх концентрацій DCI перевірено, що розрахунковий процент життєздатних КГЛ був вищим за 95% без будь-якої помітної різниці між методами обробки клітин та в порівнянні з контрольними необробленими КГЛ. Як показано на рисунку 1, DCI здатний безпосередньо зменшувати експресію гена $\beta 3$ інтегрину в дозозалежній реакції.

Вплив D-хіро-інозитулу на експресію гена стероїдогенних ферментів

Вплив на активацію гена стероїдогенних ферментів через 24 години інкубації з підвищеним дозуванням DCI у первин-

них культурах КГЛ був досліджений за допомогою RT-qPCR і виражений як співвідношення, що нормалізується референтним геном RpS7. На рисунку 2 показана крива дозозалежної реакції, сформована впливом різних концентрацій DCI на експресію генів CYP19A1 (рис. 2А) та P450scc (рис. 2Б).

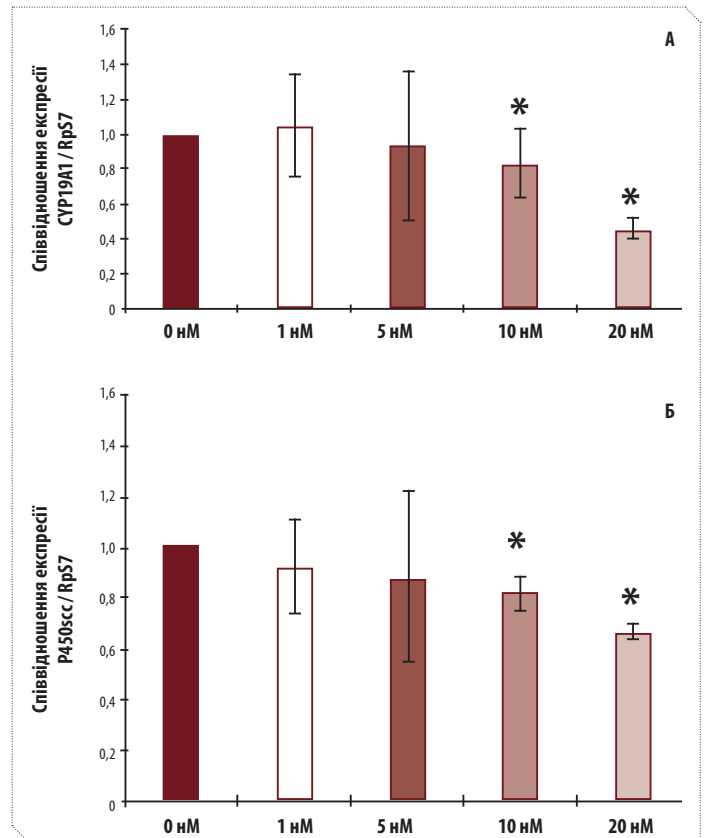


Рисунок 2А, Б. Оцінка дозозалежного впливу 24-годинної інкубації з DCI на експресію генів ароматази CYP19A1 (А) та P450scc (Б) в первинній культурі КГЛ за допомогою RT-qPCR

* відмінності у порівнянні з відповідними елементами контролю, $p < 0,05$

DCI має тенденцію зменшувати експресію обох аналізованих генів при найменших випробуваних концентраціях, і цей ефект є особливо значущим із вищими дозами DCI, які були вибрані та використані для наступних експериментів.

Підвищена дія інсуліну на гонадотропін-стимульовані гени стероїдогенних ферментів, збалансована обробкою D-хіро-інозитулом

Первинні культури КГЛ обробляли гонадотропінами в комбінації з 0,1 МО/мл інсуліну чи 20 нМ DCI або з обома.

Таблиця. Приклади, що використовувались під час аналізу RT-qPCR

Ген	Білок	Послідовність 5'-3'	Довжина амплікона (bp)	Референсна послідовність NCBI
RpS7	Рібосомальний протеїн S7	F: AATCTTTGTTCCCGTTCCTCA R: CGAGTTGGCTTAGGCAGAA	135	NM_001011.3
$\beta 3$ integrin	$\beta 3$ інтегрин	F: GACAAGGGCTCTGGAGACAG R: ACTGGTGAGCTTTCGCATCT	233	NM_000212.2
IGF1R	Рецептор 1 інсуліноподібного фактора росту (ІФР-1Р)	F: CGTGGGAGGTTGGTGATTA R: TGGCCACTCTGGTTTCAGGT	161	NM_000875.3
CYP19A1	Ароматаза	F: CCCTTCTGCGTGTGTCAT R: GATTTAAACCAGATAGCATTTCG	86	NM_000103.3
P450scc (CYP11A1)	Фермент розщеплення бокових ланцюгів холестерину	F: ACCAAGAATTTTTGCCCTT R: ATGTCCTCCCGAGTAATTCC	127	NM_000781.2

Експресія генів стероїдогенних ферментів була розрахована за реакціями RT-qPCR і виражена як відношення, яке нормалізується референсним геном RpS7. Додавання 5 нг/мл рФСГ (рис. 3) або 5 нг/мл рЛГ (рис. 4) було пов'язано зі значною активацією експресії генів як CYP19A1, так і P450scc.

Як і очікувалось, спільна інкубація з гонадотропінами з 0,1 МО/мл інсуліну призвела до значно ефективнішої індукції двох генів у порівнянні з тільки рФСГ (рис. 3А, Б) або тільки рЛГ (рис. 4А). Культуральні зразки, інкубовані з 20 нМ DCI, не мають значних відмінностей у порівнянні з ефектом, який утворюється при обробленні гонадотропіном (рис. 3 і 4).

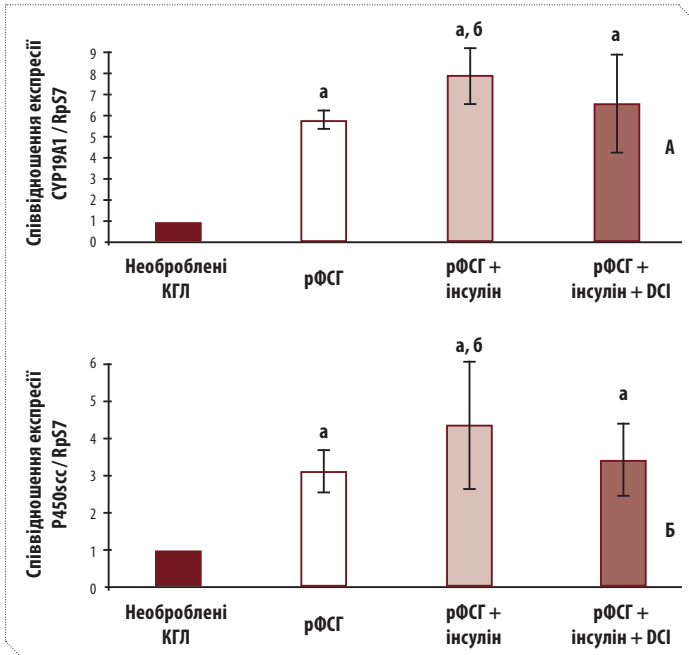


Рисунок 3А, Б. Вплив 24-годинної інкубації 5 нг/мл рФСГ на експресію гена CYP19A1 (А) і P450scc (Б) окремо та в комбінації з 0,1 МО інсуліну або 20 нМ DCI чи в первинній культурі КГЛ *in vitro*

Тим часом позитивний внесок інсуліну в індукцію стероїдогенних генів, що породжується гонадотропінами, порушується за допомогою коінкубації з DCI.

Нарешті, обидві концентрації випробуваного DCI (10 або 20 нМ) показали, що DCI здатний безпосередньо знизити експресію гена IGF-1R, тоді як інкубація з DCI та 0,1 МО інсуліну в культуральному середовищі не дає значущих відмінностей між обробленими та необробленими контрольними КГЛ (рис. 5).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У даному дослідженні ми продемонстрували, що інсулін та DCI здатні безпосередньо впливати на експресію генів двох стероїдогенних ферментів, а саме CYP19A1 та P450scc. Крім того, DCI може модулювати стимулюючий ефект на стероїдогенні гени, опосередкований як гонадотропінами, так і інсуліном.

Ефективність культурального середовища, в якому обробка DCI вплинула на регуляцію генів у первинних культурах КГЛ, була оцінена за допомогою аналізу експресії гену β3 інтегрину. Інтегрини – це мембранні рецептори, що беруть участь в адгезії клітин та позаклітинних матриць, а також у передачі сигналу, які диференційовано виражені на КГЛ [24].

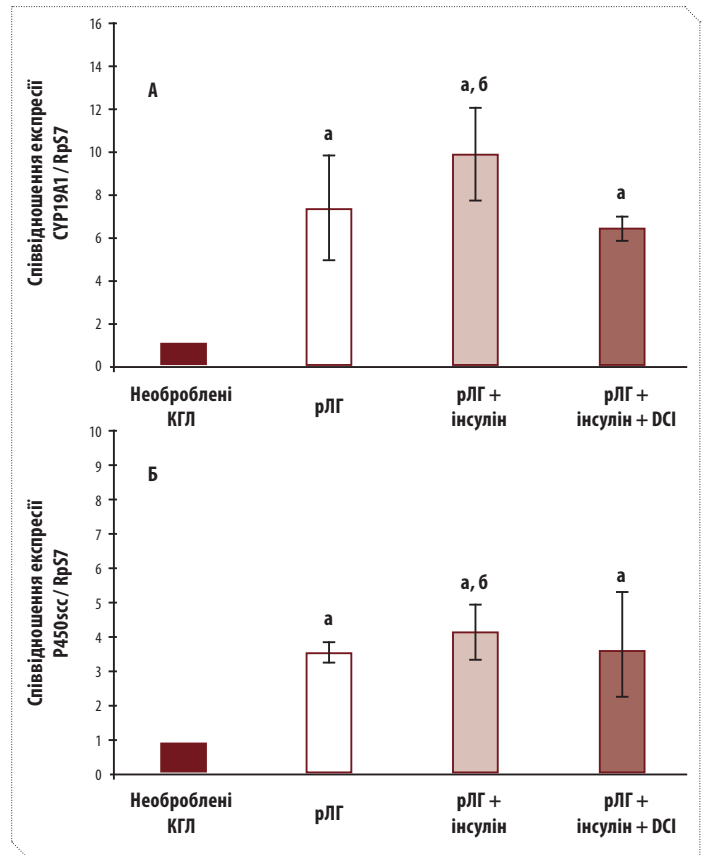


Рисунок 4А, Б. Вплив 24-годинної інкубації 5 нг/мл рЛГ на експресію гена CYP19A1 (А) і P450scc (Б) окремо та в комбінації з 0,1 МО інсуліну або 20 нМ DCI чи обом в первинній культурі КГЛ *in vitro*

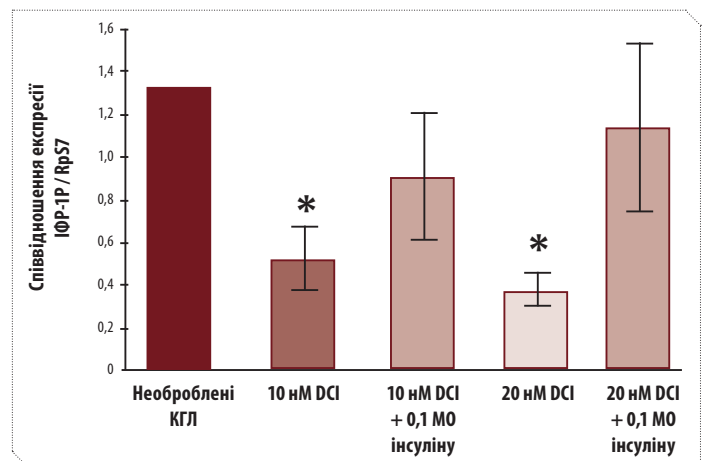


Рисунок 5. Дозозалежний ефект при 24-годинній інкубації з 10 нМ або 20 нМ DCI окремо або в комбінації з 0,1 МО інсуліну на експресію гена IGF1R в первинній культурі КГЛ *in vitro* за допомогою RT-qPCR

Показано, що інтегрини здатні регулювати різні функції КГЛ [25], а також утворення жовтого тіла [26, 27]. З цих причин було висунуто гіпотезу про можливу роль інтегринів під час фолікулогенезу [28–30].

Крім того, в іншому дослідженні, проведеному для оцінки можливих антиметастазних ефектів D-пінітолу, аналога 3-метокси-DCI, у клітинах раку передміхурової залози людини, було продемонстровано, що нецитотоксичні концентрації D-пінітолу зменшують експресію mPNC та експресію з поверхні клітин раку передміхурової залози β3

фракції інтегрину [31]. Виходячи з відсотка життєздатних клітин після аналізу вибірково тестом трипановим синім, збільшення концентрації DCI дозволило зменшити експресію гена $\beta 3$ інтегрину в усіх основних культурах КГЛ, використаних у цьому дослідженні. Крім того, наші аналізи показують, що DCI безпосередньо впливає на регуляцію гена стероїдогенних ферментів КГЛ, що зменшує експресію мРНК як CYP19A1, так і P450scc генів у дозозалежній відповіді. Ферменти P450scc каталізують численні реакції, що беруть участь у синтезі холестерину та стероїдів, і разом з ароматазою CYP19A1 необхідні для регулювання продукування естрадіолу та прогестерону в яєчнику [32].

Однак через те, що зрілі гранулезно-лютеїнові клітини, які використовуються для цього дослідження *in vitro*, можуть не відображати умови *in vivo*, експерименти також проводилися в присутності гонадотропінів та інсуліну. Обидва гонадотропіни (окремо або в комбінації) індують експресію генів CYP19A1 та P450scc [33, 34], хоча існує і гонадотропін-споріднений профіль експресії генів [35, 36]. Широко продемонстровано також, що інсулін відіграє певну роль у функціях яєчників шляхом посилення ефектів гонадотропіну, як показано в клітинах теки [37, 38] та в клітинах гранулози [39, 40]. В нашій експериментальній моделі інкубація з рФСГ або рЛГ здатна індукувати експресію генів CYP19A1 та P450scc відповідно до раніше опублікованих даних [36]. Крім того, наші дані підтвердили, що інсулін може впливати на стероїдогенез, збільшуючи стимулюючі ефекти ЛГ та ФСГ, як показано в нашому дослідженні, шляхом збільшення експресії генів стероїдогенних ферментів. Цікаво, що позитивний ефект інсуліну на гонадотропін-стимульовані КГЛ був протиставлений наявності DCI. Проте КГЛ, культивовані за наявності DCI, як і раніше, були чутливими до гонадотропінів, оскільки CYP19A1 та P450scc були значно індуковані у порівнянні з контрольними необробленими КГЛ. Оскільки також було повідомлено, що DCI відіграє роль другого про-

відника в класичних сигнальних шляхах фосфорилювання, активованих інсуліном, що викликає активацію сімейства Mg^{2+} -залежних білкових фосфатаз, які контролюють метаболізм глюкози [5], ми досліджуємо ефекти спільного оброблення DCI та інсуліном у КГЛ.

Як відомо, інсулін виконує свою функцію не тільки шляхом зв'язування рецепторів інсуліну, присутніх на поверхні клітин-мішеней, але й функціонує як ліганд для IФР-1Р [41].

Типовим лігандом для IФР-1Р є IФР, що, як вважається, має ефекти ко-гонадотропіну. В останні роки однією з найбільш вивчених патологій *in vivo*, пов'язаних із безпліддям, був СПКЯ. СПКЯ характеризується підвищеним рівнем рецепторів 1 до IФР-1Р [42], і було висунуто гіпотезу, що це є основною ланкою патогенезу синдрому та зміни статевих стероїдів, що часто зустрічається в пацієнок із СПКЯ.

IФР-1Р присутні на клітинній мембрані КГЛ [43], і було продемонстровано, що різні лікарські засоби, які спричиняють сенсibiliзацію інсуліну, такі як метформін, здатні модулювати експресію генів [20, 44]. У даному дослідженні ми показали, що DCI не тільки здатний збалансувати додатковий стимулюючий ефект на гени стероїдогенних ферментів, стимульованих гонадотропінами КГЛ, але й спочатку продемонстрували, що інкубування КГЛ при збільшенні дози DCI призвело до зменшення експресії IФР-1Р дозозалежним чином.

ВИСНОВКИ

У даному дослідженні ми можемо підтвердити вплив інсуліну як ко-гонадотропіну на клітини гранулези яєчників, і можемо продемонструвати, що DCI протидіє цьому впливу як інсулін-сенсibiliзатор. Це стало зрозумілим під час дослідження експресії декількох генів, таких як ароматаза CYP19A1, P450scc та IФР-1Р. Здатність DCI модулювати *in vitro* активність інсуліну яєчників може частково пояснити його сприятливий ефект, коли DCI застосовується при станах, пов'язаних із IP. □

МОДУЛЯЦІЯ ІНДУКОВАНИХ ГОНАДОТРОПІНОМ СТЕРОЇДГЕННИХ ФЕРМЕНТІВ В КЛІТИНАХ ГРАНУЛОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ D-ХІРО-ІНОЗИТОЛУ

Sandro Sacchi, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Federica Marinaro, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Debora Tondelli, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

D-хіро-інозитол (DCI) – це інозитолфосфоліган, який включає в себе кілька клітинних функцій, що контролюють метаболізм глюкози. DCI функціонує як другий посередник для сигналізації дії інсуліну і вважається сенсibiliзатором інсуліну, оскільки дефіцит наявності DCI у тканинах вказує на інсулінорезистентність (IP).

Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) – патологічний стан, який часто супроводжується IP. DCI позитивно впливає на численні аспекти етіології СПКЯ, зменшує загальний та вільний рівень тестостерону, знижує кров'яний тиск, нормалізує метаболізм глюкози та збільшує частоту овуляції.

Мета цього дослідження полягала в оцінці впливу DCI та інсуліну в поєднанні з гонадотропінами, а саме фолікулоstimулюючим та лютеїнізуючим гормонами на регуляцію генів стероїдогенних ферментів, підроддини A1 (CYP19A1) та розщеплення бічних ланцюгів цитохрому P450 (P450scc) родини цитохрому P450 у первинних культурах клітин гранулози людини. Ми також досліджували, чи зможе DCI як інсулінорезистентизатор протидіяти очікуваній активності інсуліну стимулювати клітини гранулози людини.

Методи. Дослідження проводилося на основних культурах клітин гранулози людини. Експресію генів оцінювали методом RT-qPCR. Статистичний аналіз проводився з використанням t-критерію Стьюдента ($p < 0,05$), встановленого для статистичної значущості.

Результати. DCI здатний зменшувати експресію генів CYP19A1, P450scc та рецептора інсуліноподібного фактора росту 1 у дозозалежній відповіді. Наявність DCI супроводжується посиленням експресії генів стероїдогенних ферментів, вироблених гонадотропін-стимульованими клітинами гранулози людини при лікуванні інсуліном.

Висновки. Інсулін виступає в ролі ко-гонадотропіну, що збільшує експресію генів стероїдогенних ферментів у клітинах гранулози, стимульованих гонадотропіном. DCI – це сенсibiliзатор інсуліну, який протидіє цьому впливу, зменшуючи експресію генів CYP19A1, P450scc та рецептора інсуліноподібного фактора росту 1. Здатність DCI модулювати активність інсуліну в яєчнику *in vitro* може частково пояснити його корисний ефект, коли він використовується для лікування станів, пов'язаних із IP.

Ключові слова: D-хіро-інозитол, стероїдогенез, інсулінорезистентність.

МОДУЛЯЦІЯ ІНДУЦІРОВАННИХ ГОНАДОТРОПІНОМ СТЕРОЇДГЕННИХ ФЕРМЕНТІВ В КЛІТИНАХ ГРАНУЛОЗИ С ПОМОЦЬЮ D-ХІРО-ІНОЗИТОЛА

Sandro Sacchi, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Federica Marinaro, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Debora Tondelli, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

D-хіро-інозитол (DCI) – це інозитолфосфоліган, який включає в себе кілька клітинних функцій, що контролюють метаболізм глюкози. DCI функціонує як другий посередник для сигналізації діяльності інсуліну і вважається сенсibiliзатором інсуліну, оскільки дефіцит наявності DCI в тканинах вказує на інсулінорезистентність (IP).

Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) – патологічне захворювання, яке часто супроводжується IP. DCI позитивно впливає на численні аспекти етіології СПКЯ, зменшує загальний та вільний рівень тестостерону, знижує кров'яний тиск, нормалізує метаболізм глюкози та збільшує частоту овуляції.

Мета цього дослідження полягала в оцінці впливу DCI та інсуліну в поєднанні з гонадотропінами, а саме фолікулоstimулюючим та лютеїнізуючим гормонами на регуляцію генів стероїдогенних ферментів, підроддини A1 (CYP19A1) та розщеплення бічних ланцюгів цитохрому P450 (P450scc) родини цитохрому P450 у первинних культурах кліток гранулези людини. Ми також досліджували, чи зможе DCI як інсулінорезистентизатор протидіяти очікуваній активності інсуліну стимулювати клітини гранулези людини.

Методи. Дослідження проводилося на основних культурах кліток гранулези людини. Експресію генів оцінювали за допомогою RT-qPCR. Статистичний аналіз проводився з використанням t-критерію Стьюдента ($p < 0,05$), встановленого для статистичної значущості.

Результати. DCI здатний зменшувати експресію генів CYP19A1, P450scc та рецептора інсуліноподібного фактора росту 1 у дозозалежним чином. Наявність DCI супроводжується посиленням експресії генів стероїдогенних ферментів, вироблених гонадотропін-стимульованими клітками гранулези людини при лікуванні інсуліном.

Висновки. Інсулін виступає в ролі ко-гонадотропіна, що збільшує експресію генів стероїдогенних ферментів в клітках гранулези, стимульованих гонадотропіном. DCI – це сенсibiliзатор інсуліну, який протидіє цьому впливу, зменшуючи експресію генів CYP19A1, P450scc та рецептора інсуліноподібного фактора росту 1. Здатність DCI модулювати активність інсуліну в яєчнику *in vitro* може частково пояснити його корисний ефект, коли він використовується для лікування станів, пов'язаних із IP.

Ключевые слова: D-хіро-інозитол, стероїдогенез, інсулінорезистентність.

МОДУЛЯЦІЯ ГОНАДОТРОПІНОМ ІНДУЦІРОВАННИХ СТЕРОЇДГЕННИХ ФЕРМЕНТІВ В КЛІТИНАХ ГРАНУЛОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ D-ХІРО-ІНОЗИТОЛУ

Sandro Sacchi, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Federica Marinaro, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Debora Tondelli, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

d-chiroinositol (DCI) is an inositolphosphoglycan (IPG) involved in several cellular functions that control the glucose metabolism. DCI functions as second messenger in the insulin signaling pathway and it is considered an insulin sensitizer since deficiency in tissue availability of DCI were shown to cause insulin resistance (IR). Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a pathological condition that is often accompanied with insulin resistance. DCI can positively affect several aspect of PCOS etiology decreasing the total and free testosterone, lowering blood pressure, improving the glucose metabolism and increasing the ovulation frequency.

The purpose of this study was to evaluate the effects of DCI and insulin combined with gonadotropins namely follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) on key steroidogenic enzymes genes regulation, cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1) and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) in primary cultures of human granulosa cells (hGCs). We also investigated whether DCI, being an insulin-sensitizer would be able to counteract the expected stimulator activity of insulin on human granulosa cells (hGCs).

Methods. The study was conducted on primary cultures of hGCs. Gene expression was evaluated by RT-qPCR method. Statistical analysis was performed applying student t-test, as appropriate ($P < 0.05$) set for statistical significance.

Results. DCI is able to reduce the gene expression of CYP19A1, P450scc and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) in dose-response manner. The presence of DCI impaired the increased expression of steroidogenic enzyme genes generated by the insulin treatment in gonadotropin-stimulated hGCs.

Conclusions. Insulin acts as co-gonadotropin increasing the expression of steroidogenic enzymes genes in gonadotropin-stimulated granulosa cells. DCI is an insulin-sensitizer that counteracts this action by reducing the expression of the genes CYP19A1, P450scc and IGF-1R. The ability of DCI to modulate *in vitro* ovarian activity of insulin could in part explain its beneficial effect when used as treatment for conditions associated to insulin resistance.

Keywords: d-chiroinositol, steroidogenesis, insulin resistance.