

ДОСЛІДЖЕННЯ УЧАСТІ TLR4 У СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХАХ, ЩО АКТИВУЮТЬСЯ В ОВАРІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ МИШЕЙ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ

О. А. КОНДРАЦЬКА, Н. Г. ГРУШКА, С. І. ПАВЛОВИЧ,
В. В. МЕШКО, Р. І. ЯНЧІЙ

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
вул. Богомольця 4, Київ, 01024, Україна
e-mail: grunay@i.ua*

*Толл подібний рецептор 4 (TLR4) є широко описаним трансмембранним білком, який бере участь у запальних процесах. Бактеріальна інфекція є одним із основних факторів, що впливає на зміну експресії TLR4. При цьому рівень останньої прямо пропорційно корелює з тяжкістю процесу, що у ряді випадків дозволяє розглядати ці рецептори як ранні маркери інфекції. Раніше показано, що за умов експериментальної ендотоксемії спостерігалось порушення функцій клітин яєчників у мишей. Патологічні зміни фолікулярного оточення ооцитів призводили до порушення мейотичного дозрівання ооцитів. Однак залучення TLR4 у активацію сигнальних шляхів в оваріальних клітинах під впливом ліпополісахариду (LPS) потребує ретельного вивчення. Дослідження даної проблеми є важливим як з точки зору розуміння патогенетичних механізмів, що опосередковують репродуктивні розлади, пов'язані з наявністю в організмі ендотоксинів, так і з метою створення ефективних терапевтичних підходів для лікування цих патологій. В представленій роботі ми дослідили фармакологічний вплив TAK242 (інгібітора TLR4) на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro* за умов впливу LPS. Дослідження проведено на кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексах (КОКК), а також на ооцитах, ізольованих від кумулюсних клітин, виділених із яєчників мишей лінії Альбіно. Нами показано, що при культивуванні КОКК та ізольованих ооцитів у присутності LPS відбувалось пригнічення мейозу. Однак попередня обробка клітин протягом 15 хвилин інгібітором TLR4 (TAK242) з наступним введенням LPS у середовище культивування покращувало мейотичне дозрівання КОКК та ооцитів, ізольованих від кумулюсних клітин. Крім того, за умов одночасного введення TAK242 та LPS у культуральне середовище не виявлено вірогідної різниці у показниках мейотичного дозрівання ооцитів порівняно із 15 хвилинною передобробкою інгібітором як для КОКК, так і для ізольованих ооцитів. Отримані дані можуть свідчити про наявність TLR4 на ооцитах і кумулюсних клітинах мишей; а також служити підставою для дослідження доцільності терапевтичного використання інгібіторів TLR4 під час захворювань, в ході розвитку яких відбувається взаємодія між TLR4 та його лігандами, зокрема LPS.*

Ключові слова: ооцити, кумулюсні клітини, ліпополісахарид, толл подібні рецептори 4, TAK242

Вступ. Толл подібні рецептори (TLR) відіграють важливу роль у вроджених і адаптивних імунних відповідях (Takashima K et al., 2009). TLR – це трансмембранні білки I типу, що функціонують як рецептори розпізнавання патернів, які активуються різноманітними патоген-асоційованими молекулярними структурами (PAMP) (Kuzmich NN et al., 2017), тобто розпізнають мікробні патогени та їх компоненти і, тим самим, ініціюють вроджену імунну відповідь і запалення (Kuzmich NN et al., 2017; O'Neill LA et al., 2013; Takashima K et al., 2009). Серед членів сімейства TLR TLR4 відіграє домінуючу роль у ініціації вродженого імунітету (Takashima K et al., 2009). Ліпополісахарид (LPS), компонент зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, є лігандом і потужним агоністом TLR4 (Wei Z et al., 2016). Активація TLR4 бактеріальним ендотоксином відповідає за розвиток хронічних та гострих запальних захворювань, включаючи сепсис, астму, хронічне обструктивне захворювання легень та інші. Розпізнавання мікробних патогенів та їх компонентів за допомогою TLR4 ініціює активацію внутрішньоклітинної передачі сигналів та призводить до вивільнення широкого спектру медіаторів запалення, включаючи оксид азоту, простагландини, цитокіни, такі як фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкін (IL)-6 та IL-1 β , інтерферон 1 типу (IFN) та хемокіни (Takashima K et al., 2009). Внаслідок взаємодії TLR4 з LPS послідовно запускаються два сигнальні каскади: перший, за участю адапторних білків TIRAP і MyD88, індукується в плазматичній мембрані, а другий, за участю адапторних білків TRAM і TRIF, починається в ранніх ендосомах після ендцитозу рецептора (Ciesielska A et al., 2021). Вважають, що модуляція шляху передачі сигналів TLR4 є потенційною стратегією специфічного впливу на патології запального генезу (Kuzmich NN et al., 2017; Takashima K et al., 2009). TAK242 – низькомолекулярна сполука, яка вибірково інгібує передачу сигналів TLR4, зв'язуючись безпосередньо із амінокислотою Cys747 у внутрішньоклітинному домені TLR4

нів та їх компонентів за допомогою TLR4 ініціює активацію внутрішньоклітинної передачі сигналів та призводить до вивільнення широкого спектру медіаторів запалення, включаючи оксид азоту, простагландини, цитокіни, такі як фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкін (IL)-6 та IL-1 β , інтерферон 1 типу (IFN) та хемокіни (Takashima K et al., 2009). Внаслідок взаємодії TLR4 з LPS послідовно запускаються два сигнальні каскади: перший, за участю адапторних білків TIRAP і MyD88, індукується в плазматичній мембрані, а другий, за участю адапторних білків TRAM і TRIF, починається в ранніх ендосомах після ендцитозу рецептора (Ciesielska A et al., 2021). Вважають, що модуляція шляху передачі сигналів TLR4 є потенційною стратегією специфічного впливу на патології запального генезу (Kuzmich NN et al., 2017; Takashima K et al., 2009). TAK242 – низькомолекулярна сполука, яка вибірково інгібує передачу сигналів TLR4, зв'язуючись безпосередньо із амінокислотою Cys747 у внутрішньоклітинному домені TLR4

(Ono Y et al., 2020). Було виявлено, що TAK242 пригнічував як MyD88-залежний шлях, так й MyD88-незалежний шлях, при цьому інгібуючий ефект TAK242 не залежав від концентрації LPS (Takashima K et al., 2009). TAK242 також ефективно пригнічував LPS-індуковане фосфорилування ядерного фактора κB (NF- κB) і IL-1 асоційовану кіназу-1 в ендотеліальних клітинах коронарних артерій людини. Таким чином, TAK242 може послаблювати запалення ендотеліальних клітин (Wei Z et al., 2016). У щурів з експериментальним сепсисом показано захисну дію TAK242 на міокард через пригнічення шляху TLR4/NF- κB та зниження експресії IL-6 і TNF- α (Liu Z et al., 2021). Зазначені вище дані дозволяють припустити, що TAK242 може бути потенційним терапевтичним протизапальним фактором. Раніше нами показано, що введення мишам ендотоксину (*E. coli* 0111:B4) призводило до розвитку вираженої запальної реакції (Grushka N et al., 2019a; Grushka NG et al., 2019b). Було також виявлено, що ін'єкції LPS викликали порушення функцій клітин яєчників у мишей. Знижувалась життєздатність та зростала загибель гранулярних клітин, як за некротичним, так і за апоптотичним шляхами. Ендотоксемія спричиняла сильне ушкодження ДНК фолікулярних клітин та зменшення в кумулюючих клітинах рівня експресії генів, важливих для здійснення фолікуло- та оогенезу. Зазначені патологічні зміни фолікулярного оточення ооцитів призводили до порушення мейотичного дозрівання ооцитів (Shepel E et al., 2018). Отже, дослідження участі TLR4 у сигнальних шляхах, що активуються в оваріальних клітинах мишей за умов LPS-індукованого запального процесу, є важливою проблемою як з точки зору розуміння патогенетичних механізмів, що опосередковують репродуктивні розлади, пов'язані з наявністю в організмі ендотоксинів, так і з метою створення ефективних терапевтичних підходів для лікування цих патологій. Представлене дослідження було проведено для вивчення ефекту TAK242 на мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro* за умов впливу LPS.

Матеріали та методи. Дослідження виконували на статевозрілих самцях мишей лінії Альбіно (масою 18–22 г), які утримувалися в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Директиви Ради ЄС від 22.09.2010 р. «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження № 3447–IV від 21.02.2006.

Для дослідження *in vitro* участі TLR4 у сигнальних шляхах, що активуються в оваріальних клітинах мишей за умов впливу LPS, використовували TAK242 (Tocris Bioscience, United Kingdom) – інгібітор TLR4. Для цього ізольовані від кумулюючих клітин ооцити та ооцити у складі кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексів (КОКК) культивували протягом 15 хвилин у середовищі з TAK242 (1 мкмоль), після цього у середовище культивування додавали LPS (1 мкг/мл). Також було проведено серію експериментів, коли інгібітор і LPS вносили в середовище одночасно. Клітини яєчників мишей виділяли неферментативно (механічно). Мейотичне дозрівання ооцитів досліджували при їх культивуванні в стерильних умовах у середовищі DME з 15 ммоль/л HEPES, при 37 °C. Через 4 години культивування підраховували ооцити, що перебували на стадії метафази I – розчинення зародкового пухирця (ЗП-), а після 20 годин – на стадії метафази II – формування першого полярного тільця (ПТ). Вираховували відношення кількості ооцитів з (ЗП-) та ооцитів з ПТ до початкової (загальної) кількості ооцитів із ЗП у відсотках (% ЗП- та % ПТ).

Результати обробляли в програмі GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Перевірку на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова–Смирнова. Статистичний аналіз проводили з використанням one-way ANOVA з подальшим множинним порівнянням за тестом Ньюмена–Кейлса. Для перевірки рівності середніх значень у двох вибірках застосовували t-критерій Ст'юдента. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Результати виражали як $M \pm m$ (середнє \pm стандартна похибка).

Результати та їх обговорення. Досліджено *in vitro* вплив 15 хвилинної попередньої обробки інгібітором TLR4 – TAK242 (1 мкмоль) у присутності LPS (1 мкг/мл) на мейотичне дозрівання ооцитів, ізольованих від кумулюючих клітин, а також у складі КОКК. Результати показали, що додавання TAK242 покращувало мейотичне дозрівання ооцитів, ізольованих від кумулюючих клітин, на обох стадіях процесу мейозу (метафаза I і II; рис. 1). Подібні дані були отримані й щодо кількості ооцитів, які досягли стадії МІІ під час їх культивування у складі КОКК (табл.1). За умов одночасного введення TAK242 та LPS у середовище культивування не виявлено вірогідної різниці у показниках мейотичного дозрівання ооцитів порівняно із 15 хвилинною передобробкою інгібітором як для ізольованих ооцитів, так і для КОКК (табл. 1). Отримані дані можуть свідчити про те, що TLR4 присутні на ооцитах і кумулюючих клітинах.

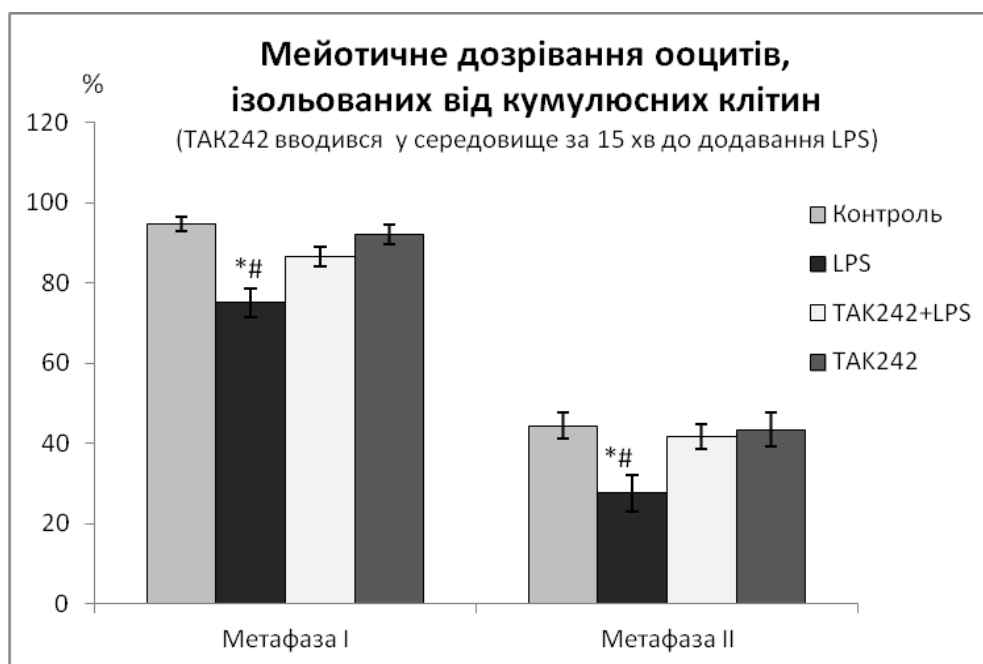


Рис. 1. Мейотичне дозрівання ооцитів, ізольованих від кумулюсних клітин, після попередньої обробки TAK242 (15 хвилин) з наступним введенням LPS у культуральне середовище

Примітка: * – $P < 0,05$ – порівняно з контролем; # – $P < 0,05$ – відносно дії TAK242+LPS.

В літературних джерелах є відомості про наявність TLR4 на гранулярних клітинах ссавців: самиць великої рогатої худоби (Shimizu T et al., 2018; Price JC et al., 2013; Bromfield JJ, Sheldon IM, 2011; Herath S et al., 2007), мишей (Guan HY et al., 2021; Shimada M et al., 2006), людини (Ernst EH et al., 2020). Також показано експресію TLR4 в кумулюсних клітинах мишей (Park HJ et al., 2021; Hosseini S et al., 2017; Shimada M et al., 2008; Hernandez-Gonzalez I et al., 2006); однак дані про наявність TLR4 в ооцитах мишей лише поодинокі (Hosseini S et al., 2020). Є відомості відносно експресії TLR4 в ооцитах людини під час гормонозалежної стадії розвитку примордіальних та первинних фолікулів (Ernst EH et al., 2020).

Отже, можна припустити, що запальна відповідь в клітинах кумулюса ініціювалася LPS через шлях TLR4 і таким чином порушувала мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro*. Проведення подальших експериментів, в ході яких TAK242 буде досліджено *in vivo* на фоні ендотоксемії, дасть змогу з'ясувати можливий терапевтичний ефект інгібітора на моделі LPS-індукованого запалення у мишей. Крім того, ми показали, що між результатами досліджень, в ході яких TAK242 додавався до середовища культивування за 15 хвилин до введення LPS, і під час яких інгібітор та LPS додавалися одночасно, не було вірогідної різниці. Такі дані дають підставу вважати, що введен-

Fig. 1. Meiotic maturation of cumulus-denuded oocytes after 15 minutes of pretreatment with TAK242, followed by addition of LPS to the culture medium

Note: * – $P < 0,05$ – vs control; # – $P < 0,05$ – vs TAK242+LPS group.

ня *in vivo* TAK242 після індукування ендотоксемії за допомогою LPS може мати ефективний терапевтичний вплив. Часто в експериментах на тваринах антисептичні фактори вводять до бактеріального зараження або LPS. Проте в клінічних дослідженнях антисептичні засоби застосовують вже після початку зараження. Крім того, відомо, що TLR4 також функціонує як рецептор для різних ендогенних лігандів, таких як фібриноген, амфотерин, білки теплового шоку, а взаємодія ендогенного ліганда з TLR4 бере участь у розвитку різних захворювань людини, включаючи сепсис та інші. Згідно даних літератури (Takashima K et al., 2009), вплив TAK242 не є дуже чутливим до молекулярної структури лігандів TLR4. Це дає підставу припустити, що інгібітор зможе забезпечити високу ефективність під час різних захворювань, при яких є важливими взаємодії між TLR4 та його ендогенними лігандами.

Результати проведених нами експериментів, а також отримані раніше дані та аналіз літературних джерел, дозволяють припустити, що одним з потенційних механізмів, за допомогою яких LPS-індукована ендотоксемія може вплинути на яєчники, є активація вродженої імунної відповіді на рівні яєчників. А саме: LPS потрапляє в кровотік, далі проникає в фолікули яєчників, зв'язується з TLR4, що призводить до індукції клітинної відповіді і продукції прозапальних медіаторів.

Таблиця 1.

Мейотичне дозрівання (стадія метафази II) КОКК та ооцитів ізольованих від кумулюсних клітин за умов: 1) попередньої обробки інгібітором ТАК242 (15 хвилин) та 2) при одночасному введенні ТАК242 і LPS у культуральне середовище

Table 1.

Meiotic maturation (metaphase II stage) of COCs and cumulus-denuded oocytes under the conditions of: 1) pretreatment with TAK242 (15 minutes) or 2) simultaneous introduction of TAK242 and LPS to the culture medium

Вплив	Ізольовані ооцити (передобробка ТАК242 за 15 хв до введення LPS)	Ізольовані ооцити (одночасне введення ТАК242 і LPS)	КОКК (передобробка ТАК242 за 15 хв до введення LPS)	КОКК (одночасне введення ТАК242 і LPS)
Контроль	44,43±3,17	44,43±,17	42,20±3,77	42,20±3,77
LPS	27,60±4,45*#	27,60±4,45*#	22,61±4,67*#	22,61±4,67*#
ТАК242+LPS	41,65±3,10	42,03±2,46	46,20±8,97	45,0±8,45

Примітка: * – $P < 0,05$ – відносно контролю; # – $P < 0,05$ – відносно дії ТАК242+LPS.

Note: * – $P < 0,05$ – vs control; # – $P < 0,05$ – vs TAK242+LPS group.

Додавання LPS до середовища дозрівання ооцитів мишей в наших експериментах пригнічувало здатність ооцитів до розвитку, що свідчить про його прямий вплив на ооцити. Не виключений й інший механізм, коли LPS викликає запалення тканини (наприклад, ендометрит або мастит), проте сам ендотоксин не потрапляє в кровотік. В цьому випадку в плазмі підвищується вміст прозапальних медіаторів, які потрапляють через плазму в фолікулярну рідину фолікулів яєчників і таким чином впливають на ооцит, оточений фолікулярними клітинами. Необхідні подальші дослідження, які дозволять з'ясувати чи є негативний вплив на компетентність ооцитів результатом прямої дії LPS або ж він виникає внаслідок збільшення кількості вторинних запальних факторів. Ідентифікація біомолекул в плазмі та фолікулярній рідині, які порушують здатність ооцитів до дозрівання, могла б сприяти з'ясуванню механізму, завдяки якому ендотоксемія знижує якість ооцитів.

Висновок. Фармакологічним шляхом встановлено наявність TLR4 на ооцитах і кумулюсних клітинах мишей. Доведено можливість безпосереднього впливу LPS через TLR4 на мейотичне дозрівання ооцитів. Результати експериментів, отримані під час досліджень впливу ТАК242 на КОКК можуть свідчити про доцільність терапевтичного використання інгібіторів TLR4 під час захворювань, в ході розвитку яких відбувається взаємодія між TLR4 та його лігандами, зокрема LPS.

Список літератури / References:

- Bromfield JJ, Sheldon IM. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology*. 2011; 152(12): 5029–5040. doi:10.1210/en.2011–1124.
- Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2021; 78(4): 1233–1261. doi:10.1007/s00018–020–03656–y.
- Ernst EH., Amoushahi M., Sørensen AS., et al. Distinct expression patterns of TLR transcripts in human oocytes and granulosa cells from primordial and primary follicles. *J Reprod Immunol*. 2020; 140: 103125. doi:10.1016/j.jri.2020.103125.
- Grushka N., Pavlovych S., Kondratska O., et al. Effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on morpho-functional state of immunocytes under the condition of experimental endotoxemia in mice. *World J Pharm Pharm Sci*. 2019a; 8(8): 161–173. doi:10.20959/wjpps20198–14468.
- Grushka N.G., Pavlovych S.I., Kondratska O.A., et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase contributes to the reduction of oxidative stress in murine liver under the conditions of experimental endotoxemia. *Pathologia*. 2019b; 16(3): 323–327. doi:10.14739/2310–1237.2019.3.188796 (in Ukrainian).
- Guan HY., Xia HX., Chen XY., et al. Toll-like receptor 4 inhibits estradiol secretion via NF-κB signaling in human granulosa cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 629554. doi:10.3389/fendo.2021.629554.
- Herath S., Williams EJ., Lilly ST., et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*. 2007; 134(5): 683–693. doi:10.1530/REP–07–0229.
- Hernandez-Gonzalez I., Gonzalez-Robayna I., Shimada M., et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol*. 2006; 20(6): 1300–1321. doi: 10.1210/me.2005–0420.
- Hosseini S., Dehghani-Mohammadabadi M., Ghafarri Novin M., et al. Toll-like receptor4 as a modulator of fertilization and subsequent pre-implantation development following in vitro maturation in mice. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 78(5). doi:10.1111/aji.12720.

10. Hosseini S., Hosseini S., Salehi M. Upregulation of Toll-like receptor 4 through anti-miR-Let-7a enhances blastocyst attachment to endometrial cells in mice. *J Cell Physiol.* 2020; 235(12): 9752–9762. doi:10.1002/jcp.29787.
11. Kuzmich NN., Sivak KV., Chubarev VN., et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4): 34. doi:10.3390/vaccines5040034.
12. Liu Z., Yang K., Deng T., et al. Protective effect of TAK242 blocking Toll-like receptor 4 pathway on septic myocardial injury and cardiac dysfunction. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2021; 33(10): 1226–1231. doi:10.3760/cma.j.cn121430–20210620-00915.
13. O'Neill LA., Golenbock D., Bowie AG. The history of Toll-like receptors – redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(6): 453–460. doi:10.1038/nri3446.
14. Ono Y., Maejima Y., Saito M., et al. TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 694. doi:10.1038/s41598-020-57714-3.
15. Park HJ., Kim B., Koo DB., et al. Peroxiredoxin 1 controls ovulation and ovulated cumulus-oocyte complex activity through TLR4-derived ERK1/2 signaling in mice. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(17): 9437. doi:10.3390/ijms22179437.
16. Price JC., Bromfield JJ., Sheldon IM. Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. *Endocrinology.* 2013; 154(9): 3377–3386. doi:10.1210/en.2013-1102.
17. Shepel E., Grushka N., Makogon N., et al. Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. *Pharmacol Rep.* 2018; 70(6): 1146–1149. doi:10.1016/j.pharep.2018.06.005.
18. Shimada M., Hernandez-Gonzalez I., Gonzalez-Robanya I., et al. Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 3228–3239.
19. Shimada M., Yanai Y., Okazaki T., et al. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development.* 2008; 135(11): 2001–2011. doi:10.1242/dev.020461.
20. Shimizu T., Ishizawa S., Magata F., et al. Involvement of lipopolysaccharide in ovarian cystic follicles in dairy cow: Expressions of LPS receptors and steroidogenesis-related genes in follicular cells of cystic follicles. *Anim Reprod Sci.* 2018; 195: 89–95. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.05.010.
21. Takashima K., Matsunaga N., Yoshimatsu M., et al. Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(7): 1250–1262. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00297.x.
22. Wei Z., Sun X., Xu Q., et al. TAK-242 suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in human coronary artery endothelial cells. *Pharmazie.* 2016; 71(10): 583–587. doi:10.1691/ph.2016.6512.

THE RESEARCH OF TLR4 INVOLVEMENT IN SIGNALING PATHWAYS ACTIVATED IN MURINE OVARIAN CELLS UNDER THE INFLUENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDE

O. A. Kondratska, N. G. Grushka, S. I. Pavlovyh, V. V. Meshko, R. I. Yanchii

Toll-like receptor 4 (TLR4) is a widely described transmembrane protein involved in the inflammatory process. Bacterial infection is one of the main factors influencing the change in TLR4 expression. At the same time, the level of TLR4 expression directly correlates with the severity of the process, which in some cases allows considering these receptors as an early markers of infection. Early it was shown disruption of ovarian cell functions under the conditions of experimental endotoxemia in mice. Pathological changes of follicular environment of oocytes resulted in impairment of oocyte meiotic maturation. However, involvement of TLR4 in activation of signaling pathways in ovarian cells under the influence of lipopolysaccharide (LPS), requires careful study. In the present work we have investigated pharmacological effect of TAK242 (inhibitor of TLR4) on oocyte meiotic maturation in vitro under the influence of LPS. The study was done on cumulus oocyte complexes (COCs) and oocytes, denuded from cumulus cells, which were isolated from ovaries of Albino mice. It was shown that LPS inhibited meiotic maturation in vitro of COCs and cumulus-denuded oocytes. However, 15 min pretreatment with TLR4 inhibitor (TAK242) with the subsequent addition of LPS to the culture medium, improved meiotic maturation of both COCs and cumulus-denuded oocytes. Moreover, simultaneous exposure to TAK242 and LPS did not show any significant differences in meiotic maturation of both COCs and cumulus-denuded oocytes compared with 15 min pretreatment with TAK242. The results obtained may indicate the presence of TLR4 on murine oocytes and cumulus cells. Also the results can serve as the basis for the research of feasibility of therapeutic use of TLR4 inhibitors in diseases in the course of which interaction between TLR4 and its ligands (in particular LPS) occur.

Keywords: oocytes, cumulus cells, lipopolysaccharide, toll-like receptors 4, TAK242.

Отримано редколегією 10.02.2022 р.