

УДК 576.8.097.5,591.465.1,615.27

Т. Ю. Вознесенська, канд. біол. наук,

О. А. Шепель, канд. біол. наук,

Т. В. Блашків, канд. біол. наук

ПОШКОДЖЕННЯ ДНК КУМУЛЮСНИХ КЛІТИН В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ ЯЄЧНИКІВ У МИШЕЙ

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

Автоімунні патології жіночої репродуктивної системи, зокрема яєчників, широко розповсюджені й негативно позначаються на народжуваності. У клініці ці патології трапляються як окреме захворювання та як компонент поліендокринних автоімунних синдромів, зокрема недостатності кори надниркових залоз автоімунного генезу, автоімунний тиреоїдит, ревматоїдний артрит, гломерулонефрит. Оскільки причини автоімунної патології яєчників залишаються точно не встановленими в більшості випадків, а кількість жінок з даними розладами в усьому світі збільшується [1–3], актуальними є дослідження, які проводяться на моделях з використанням тварин, спрямовані на з'ясування молекулярно-генетичних механізмів регуляції оваріальної функції та визначення як можливої етіології автоімунної патології яєчників, так і механізмів їх супресії. Новітні стратегії оцінки, що включають геноміку, транскриптоміку, протеоміку та метаболоміку, профілів ооцитів, гранулярних і кумулюсних клітин й ембріонів надають виняткові переваги та виявляють приховані сьогодні обмеження допоміжних репродуктивних технологій при ліку-

ванні певних видів жіночої безплідності. Такими можуть бути пошкодження інтегральної цілісності ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів за умов імунного ушкодження яєчників і впливу цитокінів. Як експериментальна модель імунного ушкодження яєчників використовується імунізація тварин алогенним антигеном яєчників [4]. Ця модель найбільш відповідно відтворює етіологію автоімунної патології яєчників у жінок.

Метою роботи стало визначення оцінки інтегральної цілісності та рівня пошкодження ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів у мишей в умовах впливу експериментального імунного ушкодження яєчників і цитокіноподібного ендотеліального та моноцит-активуючого поліпептиду (ЕМАР II).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилися на статевозрілих самках мишей лінії СВА. Кількість дослідних тварин у кожній експериментальній групі дорівнювала 10. Модель експериментального імунного ушкодження яєчників відтворювали за допомогою імунізації мишей антигеном алоген-

ного яєчника білих лабораторних мишей. На першому етапі мишей імунізували підшкірно суспензією антигену яєчника (2 мг білка на мишу 20 г) у повному ад'юванті Фрейнда. Далі тварин імунізували за зростаючою кількістю антигену внутрішньовенно (0,5; 0,75; 1,0 та 1,4 мг білка на мишу 20 г). Через 6 днів після останнього введення антигену тварин наркотизували нембуталом і забирали яєчник для подальших досліджень. Контрольними були тварини, яким вводили фізіологічний розчин за цією ж схемою.

У другій експериментальній групі тварин проводили вивчення дії цитокіноподібного пептиду ЕМАР II у концентрації 2 мкг/мл. Об'єктом дослідження були клітини кумулюсного оточення ооцитів мишей лінії СВА. Критеріями оцінки ступеня фрагментації ДНК у клітині є довжина «хвоста» комети, частка ДНК, що мігрувала, й інтегральний показник — момент «хвоста». Вважається, що розміри «хвоста» ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем фрагментації ДНК [5].

Метод ДНК-комет полягає в мікроелектрофорезі лізованих клітин, за яким у флуоресцентному мікроскопі фрагментова-

не ядро утворює на електрофоретичній графічній плівці своєрідний ореол у вигляді електрофоретичного сліду, так званої комети. В основі методу лежить опосередкована впливом постійного електричного поля міграція ДНК ізольованих клітин в агарозному гелі. Електрофорез проводили при напруженості 0,6 В/см протягом 25 хв. Розчин для забарвлення (5 % пропідіум йодид) готували безпосередньо перед використанням. Забарвлення пропідіумом йодидом достатньо чітко виявляє форму комет клітин кумулюсного оточення ооцитів. Кількість комет підраховували при збільшенні $\times 200$ – 400 . Рахували у зразку не менше 500 клітин. Комети поділяли на 5 класів залежно від співвідношення матеріалу ДНК у «голові» та «хвості» комети [5; 6].

Результати дослідження та їх обговорення

Результати кількісного кометного аналізу клітин кумулюсного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального імунного ушкодження яєчників і впливу ендотеліального та моноцит-активуючого поліпептиду (ЕМАР II) наведено в табл. 1.

Встановлено, що експериментальне імунне ушкодження яєчників спричиняє загибель $\sim 27\%$ кумулюсних клітин, кількість клітин із пошкодженою ДНК становить $85,5\%$, більшість комет кумулюсних клітин із двонитковими розривами ДНК зараховано до 2–3 класу.

Цитокіноподібний пептид ЕМАР II в концентрації 2 мкг/мл зумовлює загибель 46% кумулюсних клітин, кількість клітин із двонитковими розривами ДНК — $57,5\%$, більшість комет зараховано до 0/1 класу.

Відомо, що надлишкова продукція цитокінів та інших медіаторів запалення (монооксиду азоту, ейкозаноїдів) викликає порушення регулювальної функції імунної системи, призводить до їх неконтрольованого виділення не тільки в осередку запалення, але і в циркулюючій крові,

порушення балансу між прозапальними та протизапальними цитокінами на користь прозапальних [7]. Отже, медіатори запалення із чинників, що захищають організм, стають пошкоджувальними, порушують мікроциркуляторну систему органів і тканин за межами первинного осередку запалення. Порушується функція органів і систем, починає розвиватися синдром системної реакції на запалення, що призводить до виникнення поліорганної дисфункції.

Експериментальне імунне ушкодження яєчників мишей викликає активацію імунної системи [8], призводить до виникнення генералізованого запалення, опосередкованого медіаторами запалення, зокрема каскадом цитокінів [9], що спричинює розвиток синдрому системної реакції на запалення. Це є причиною виникнення поліорганної дисфункції в органах репродуктивної системи, яка проявляється порушенням оваріальної функції, дисрегуляцією скоротливості яйцепроводів і міометрія, пригніченням розвитку ембріонів [10].

У нашій роботі оцінка співвідношення матеріалу ДНК у «голові» та «хвості» комети як показника функціонування геному клітин кумулюсного оточення ооцитів дає підстави стверджувати, що експериментальне імунне ушкодження яєчників, так само як і вплив цитокіноподібного пептиду, може

Таблиця 1

Кількісна оцінка впливу експериментального імунного ушкодження яєчника та цитокіноподібного пептиду ЕМАР II на цілісність ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів мишей

Розподіл комет за класами, %	Вплив	
	Імунізація	ЕМАР II
0/1	14,5	52
2	28	19
3	54	21
4	3,5	8

змінювати активність експресії генів і процеси пошкодження ДНК у кумулюсних клітинах.

Подальші дослідження повинні бути спрямовані на оцінку якості ооцитів за станом геному клітин їх кумулюсного оточення. Отримані результати мають надати експериментальне обґрунтування для створення нових тест-систем для передбачення якості ембріона та наслідку вагітності у жінок, зокрема з автоімунною патологією репродуктивної системи, в програмах допоміжних репродуктивних технологій.

Висновок

Нами вперше проведена оцінка співвідношення матеріалу ДНК у «голові» та «хвості» комети клітин кумулюсного оточення ооцитів як показника інтегральної цілісності геному. Отримані результати дають підстави стверджувати, що експериментальне імунне ушкодження яєчників у мишей і цитотоксичний вплив пептиду ЕМАР II можуть посилювати процеси ушкодження та репарації, що проявляється як двонитковий розрив у ДНК кумулюсних клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Inhibin α gene promoter polymorphisms in Korean women with idiopathic premature ovarian failure* / S. H. Yoon, Y. M. Choi, M. A. Hong [et al.] // *Hum Reprod.* – 2012. – Vol. 27, N 6. – P. 1870–1873.
2. *Anti-Mullerian hormone serum level as a predictive marker of ovarian function in Taiwanese women* / K. C. Chao, C. H. Ho, W. Y. Shyong [et al.] // *J Chin Med Assoc.* – 2012. – Vol. 75, N 2. – P. 70–74.
3. *Psychosocial adjustment in women with premature menopause: a cross-sectional survey* / E. Mann, D. Singer, J. Pitkin [et al.] // *Climacteric.* – 2012. – Vol. 15, N 5. – P. 481–489.
4. *Створення і порівняльний аналіз двох моделей автоімунного ушкодження яєчників у мишей* / І. М. Алексеева, Т. Ю. Вознесенська, Н. В. Макогон [та ін.] // *Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка* : тез. докл. 2-й междунар. науч. конф. – Одесса, 2005. – С. 95–100.
5. *Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing*

levels of DNA damage in canine and feline leukocytes / P. R. Heaton, R. Ransley, C. J. Charlton [et al.] // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 132, N 6. – P. 1598–1603.

6. *Каменський В. О.* Аналіз фрагментації ДНК індивідуальних клітин методом гелю-мікрофорезу: модифікація фарбування солями срібла для одержання постійних препаратів / В. О. Каменський, М. Д. Луцик, Р. С. Стойка // *Український біохімічний журнал.* – 2005. – Т. 77, № 6. – С. 105–108.

7. *Биохимические* изменения в тканях внутренних органов крыс при развитии системного воспалительного ответа / Е. Д. Якубенко, А. В. Са-

вустьяненко, В. В. Оленич [и др.] // *Питання експериментальної та клінічної медицини.* – 2009. – Вип. 13, Т. 13. – С. 94–101.

8. *Изменения* в тимусе и лимфоузлах при иммунном повреждении яичников у мышей / И. Н. Алексеева, Т. М. Брызгина, В. С. Сухина [и др.] // *Проблемы репродукции.* – 2006. – Т. 12, № 4. – С. 38–41.

9. *Продукція* імунорегульованих цитокінів при аутоімунному ураженні яєчників у ссавців / Р. І. Янчій, Т. Ю. Вознесенська, О. А. Шепель [та ін.] // *Фізіологічний журнал.* – 2009. – Т. 55, № 5. – С. 35–41.

10. *Сердюк О. Н.* Экспериментальное иммунное поражение яичников: особенности сократительной активности яйцеводов и миометрия, пре- и постимплантационная смертность эмбрионов у мышей / О. Н. Сердюк, Ю. П. Бидзиля, Р. И. Янчий // *Проблемы репродукции.* – 2010. – Т. 16, № 3. – С. 19–23.

Робота виконана у рамках програми «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболоміка в системній біології» Пост. Президії НАН України № 11 § 39 від 11.11.2011 р.

УДК 576.8.097.5,591.465.1,615.27

Т. Ю. Вознесенська, О. А. Шепель, Т. В. Блашків
ПОШКОДЖЕННЯ ДНК КУМУЛЮСНИХ КЛІТИН В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ ЯЄЧНИКІВ У МИШЕЙ

Вперше наводиться співвідношення матеріалу ДНК у «голові» і «хвості» комети як показник інтегральної цілості геному клітин кумулюсного оточення ооцитів. Встановлено, що експериментальне імунне uszkodження яєчників у мишей і надлишкова продукція цитокінів можуть змінювати процеси uszkodження та репарації, що проявляється як двонитковий розрив ДНК.

Ключові слова: ДНК-комети, експериментальне імунне uszkodження яєчників, кумулюсні клітини.

UDC 576.8.097.5,591.465.1,615.27

T. Yu. Voznesenska, O. A. Shepel, T. V. Blashkiv
CUMULUS CELLS DNA DAMAGE UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNE DESTRUCTION OF OVARIES IN MICE

Evaluation of integrated genome integrity, the ratio of DNA material in the “head” and “tail” of the comet, as an indicator of the functioning oocyte cumulus cell genome, gives reason to believe that immune ovarian failure as well as cytokines can alter the activity of gene expression and processes damage and repair, manifested as double-stranded DNA.

Key words: DNA comet, immune ovarian failure, cumulus cells.

УДК 615.256;615.3

М. А. Мохорт, *д-р мед. наук, проф.*,
І. В. Герашенко

АНАЛІЗ ТОКОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ ІМІДАЗО[1,2-А]ЗЕПІНІЮ

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ

Незважаючи на постійне вдосконалення знань про причини, фактори та механізми розвитку передчасних пологів, сьогодні кількість передчасно народжених дітей, а разом із тим і процент пренатальної захворюваності та смертності неуклінно зростають [6].

Шляхи для розв'язання проблеми передчасних пологів можуть мати три напрямки: запобігання, лікування та догляд за передчасно народженою дитиною. Кожен із напрямків має свої позитивні та негативні сторони. Широта впливу різних

етиологічних факторів, що характеризуються лише як ті, що були притаманні жінкам, які передчасно народили, не дозволяє лікарям ефективно вдаватися до профілактичних заходів. Натомість, створення перинатальних центрів не викликає подібних практичних проблем, але високовартісне обладнання є перешкодою для їх відкриття в економічно нерозвинутих країнах. У арсеналі медикаментозних препаратів лікарі сьогодні мають засоби різних фармакологічних груп, які характеризуються утеролітичною активніс-

тю. Однак поряд із необхідною утеролітичною активністю більшість із відомих препаратів проявляють значні побічні ефекти, що потребують фармакологічної корекції як для матері, так і для плода. У зв'язку зі складністю та комплексністю токолітичної терапії актуальним стає пошук нового селективного й ефективного утеролітичного препарату, який би задовольняв потреби практичної медицини.

Одними з перших на початку ХХІ ст. здійснили пошук нового токолітичного препарату