

**МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ І ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН,
ЇХ ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ, ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ
В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТУ**

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (м. Київ)

tblashkiv@gmail.com

Робота виконана в рамках програми НАН України «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболоміка в системній біології» за відомчою темою «Дослідження молекулярно-генетичних та епігенетичних механізмів функціонування жіночої репродуктивної системи при експериментальній аутоімунній патології»

Вступ. Гломерулонефрит, зокрема імунної етіології, представляє серйозну проблему для репродуктивного здоров'я жінок. Так, є дані про значний відсоток передчасних пологів та перинатальних втрат плода у пацієнток із мембранозним гломерулонефритом та ІgА-гломерулонефритом. А також про те, що в 90% жінок із мембранозним гломерулонефритом спостерігається народження здорових дітей [7]. Репродуктивна функція може бути порушена як самим гломерулярним захворюванням, так і внаслідок глюкокортикоїдної та цитостатичної терапії [1,2]. Проте, на сьогодні дані про мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх фолікулярного оточення та імунокомпетентних клітин в умовах експериментального гломерулонефриту відсутні.

Метою роботи було в умовах експериментального імунного гломерулонефриту у мишей оцінити мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів, цілісність ДНК кумулюсних клітин та клітин тимуса і лімфатичних вузлів, а також експресію специфічних генів в клітинах кумулюсного оточення ооцитів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведене з використанням невагітних самок мишей лінії СВА, масою 16-20 г. При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи.

Тварини були розділені на 2 експериментальні групи: I – контрольна (n = 8); II – експериментальна – тварини, імунізовані антигенною суспензією нирки (n = 8). Модель експериментального імунного гломерулонефриту у мишей створена шляхом імунізації білих лабораторних мишей I покоління суспензією антигену нирки, отриманої від материнської особи. Імунізацію тварин проводили з розрахунку 10 мкл суспензії на 10 грамів маси тіла за наступною схемою: 3-разове внутрішньочеревне 1 раз на добу з інтервалом в 1 день; повторно імунізацію проводили

через 3 тижні одноразово внутрішньочеревно у тій самій дозі. Перед початком і під час експерименту оцінювали об'єктивний статус тварин (зовнішній вигляд, загальну рухову активність, потреба в їжі та воді, 2 рази на тиждень визначали масу тіла); видільну функцію нирок (за кількістю спонтанних сечовиділень за добу, у разовій порції сечі, використовуючи тест-смужки визначали білок (діагностичні тест-смужки Citolab для швидкого виявлення білку, «Фармаско», Україна). Після закінчення дослідів тварин виводили з експерименту шляхом перерізання спинного мозку під ефірним наркозом з дотриманням правил евтаназії. Внутрішні органи (яєчники, нирки, тимус, лімфатичні вузли) забирали для проведення подальших досліджень.

З яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити. Після 2 год культивування підраховували ооцити (% до загальної кількості), що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), а після 20 год – на стадії метафази II (формування першого полярного тільця).

Шляхи клітинної загибелі (кумулясних клітин та клітин тимуса і лімфатичних вузлів) вивчали за допомогою метода прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 та йодид пропідіума. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні особливості ядерного матеріалу. Оцінку проводили не менш як 200 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопу «Люмам І-1» (ЛОМО, Росія) з водно-імерсійним об'єктивом х85 та з відео системою передачі зображення на комп'ютер.

Для виявлення пошкоджень ДНК в ядрах кумулюсних клітин та клітин тимуса і лімфатичних вузлів використовували метод ДНК-комет (лужний). Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮМАМ І-1 (Росія) та відео систему передачі зображення на комп'ютер при застосуванні водно-імерсійного об'єктива (Ч30). На кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 400 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у «голові» та «хвості» комети поділяли на 5 класів (0-4). Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс «ДНК – комет» ($I_{\text{ДК}}$), який обчислювали за формулою: $I_{\text{ДК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$,

де $n_0 - n_4$ – число ДНК-комет кожного типу, Σ – сума підрахованих ДНК-комет.

Для кількісної оцінки експресії специфічних генів (HAS2, COX2 і Grem1) в клітинах кумулюсного оточення ооцитів використовували метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, США); $p < 0.05$ вважалося статистично вірогідним.

Результати дослідження та їх обговорення.

В умовах експериментального імунного гломерулонефриту відбувається:

1) зниження кількості виділених з одного яєчника ооцитів до $10,3 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) клітин у порівнянні з $15,2 \pm 0,4$ ооцитів у контролі; зменшення відсотка ооцитів, які розчиняли зародковий пухирець до $30,3 \pm 1,1\%$ ($p < 0,01$) у порівнянні з такою $76,4 \pm 3,2\%$ у контролі, а також зниження відсотка ооцитів здатних до формування першого полярного тільця до $25,9 \pm 1,5\%$ ($p < 0,01$) у порівнянні з такою $53,8 \pm 1,2\%$ в контрольній групі тварин; збільшення (у порівнянні з контролем) кількості ооцитів з атиповою морфологією (нерівномірно гранульованою цитоплазмою, ознаками фрагментації цитоплазми);

2) зменшення кількості живих кумулюсних клітин до $41,9 \pm 0,5\%$ ($p < 0,001$) у порівнянні з $74,2 \pm 1,2\%$ клітин в контролі; збільшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу до $40,3 \pm 0,7\%$ ($p < 0,001$) у порівнянні з $19,0 \pm 0,8\%$ клітин в контролі, а також підвищення рівня некрозу кумулюсних клітин до $17,8 \pm 0,6\%$ у порівнянні з $6,8 \pm 0,4\%$ у контролі;

3) зменшення відсотку живих лімфоцитів, виділених з лімфовузлів до $71,1 \pm 1,1\%$ ($p < 0,01$) при $79,1 \pm 2,2\%$ клітин в контролі; підвищується кількість клітин лімфовузлів з морфологічними ознаками некрозу – $23,6 \pm 0,7\%$ ($p < 0,001$) при $13,2 \pm 1,5\%$ клітин в контролі. При цьому, рівень апоптозу лімфоцитів, порівняно із контрольною групою знижувався не вірогідно – $5,3 \pm 0,6\%$ при $7,7 \pm 1,6\%$ клітин в контролі;

4) зменшення життєздатності клітин тимуса до $87,7 \pm 0,7\%$ ($p < 0,001$) порівняно з $94,5 \pm 0,8\%$ клітин в контролі, посилювався некроз тимоцитів до $3,8 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$) при $1,9 \pm 0,4\%$ клітин в контролі, а також виявлено посилення апоптозу клітин тимуса – $8,5 \pm 0,7\%$ ($p < 0,001$) при $3,6 \pm 0,9\%$ клітин в контролі;

5) збільшення кількості ядер кумулюсних клітин із одностривковими розривами ДНК 4 класу, який характеризує максимальне ушкодження ДНК до $74,7\%$ порівняно з $0,2\%$ клітин цього ж класу у контрольній групі;

відсоток клітин з ядрами 3-го класу збільшувалася до $19,8\%$ при $0,6\%$ у контролі; збільшується відсоток ядер клітин 2-го класу до $4,2\%$ при $2,2\%$ у контролі, відсоток клітин 1-го класу становив $1,1\%$ при $12,4\%$ у контролі, а відсоток клітин 0-го класу (характеризує відсутність первинних пошкоджень ДНК) становив $0,2\%$ при $84,6\%$ клітин у контролі (**рис.**);

6) збільшення відсотку ядер клітин лімфовузлів із 4-м та 3-м класом пошкодження ДНК, відповідно, до $74,5\%$ та 24% , відповідно, при 0% та 0% таких самих типів клітин у контролі. Відсоток комет 2-го та 1-го класів становив $1,5\%$ та 1% , відповідно, при 3% та 7% клітин вище згаданих типів у контролі, відсоток клітин лімфовузлів з 0-м класом пошкодження ДНК (характеризує відсутність первинних пошкоджень ДНК) становив 0% при 90% клітин такого ж класу у контролі;

7) збільшення відсотку клітин тимуса із 4-м та 3-м класом пошкодження ДНК, відповідно, до 45% та 50% , відповідно, при 0% та 2% таких самих типів клітин у контролях. Відсоток ядер клітин тимуса з 2-м класом пошкодження становив 10% при 5% у контролі. Кількість комет 1-го та 0-го класів – 2% та 0% , відповідно, при 16% та 77% клітин вищезгаданих типів у контролях;

8) зниження експресії гену Grem1 в $1,47$ разів, тоді як експресія HAS2 та COX2 вірогідно не змінювалася, $1,06$ та $1,05$ разів, відповідно.

З метою дослідження імунних захворювань нирок та розробки тактики їх терапії використовують експериментальні моделі ушкодження нирок, що відображають особливості патогенезу різних варіантів даного захворювання [3-5].

За даними літератури відомо, що, розвиток гломерулонефриту за імунним механізмом пов'язаний: а) з наявністю спільних перехресно-реагуючих антигенів мікроорганізмів (бактерій, вірусів та ін) і антигенів базальної мембрани клубочків; б) з інтенсивною появою на базальній мембрані гломерул антигенів

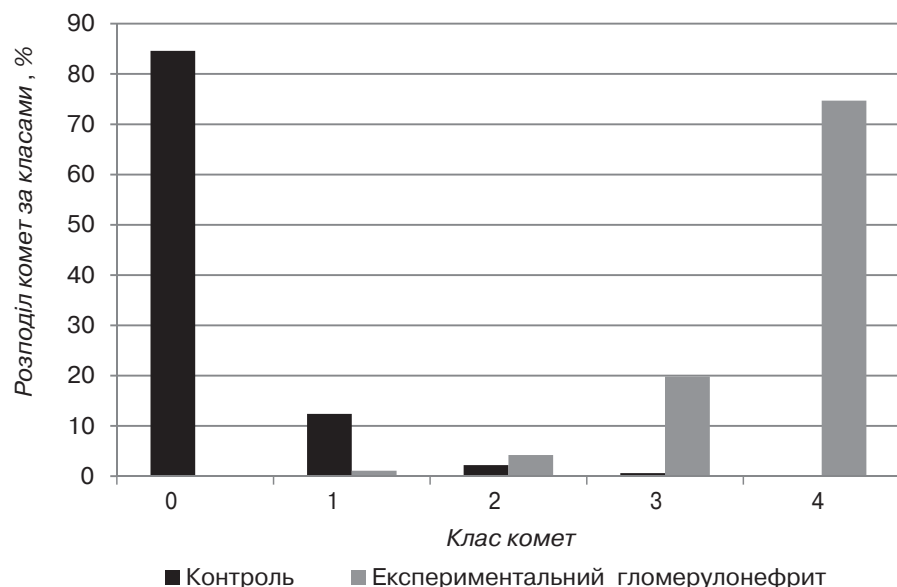


Рис. Кількісна оцінка впливу експериментального гломерулонефриту на цілісність ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів. Розподіл комет за класами у %.

головного комплексу гістосумісності (зокрема, HLA-DR2 і DR3 антигенів); в) з пошкодженням ниркової тканини і вивільненням прихованих антигенів або детермінант гломерулярної базальної мембрани, до яких немає толерантності [6].

Нами встановлено, що у мишей в умовах експериментального імунного гломерулонефриту, збільшується загибель кумулюсних клітин, що є важливою причиною порушення мейотичного дозрівання ооцитів, яке підтверджується зменшенням кількості ооцитів з першим полярним тільцем. Ймовірно, в даних експериментальних умовах будуть порушуватися механізми, пов'язані з відновленням мейотичного дозрівання та подальшим розвитком ооцитів і процесом запліднення. Нами також було виявлено значний рівень ураження як тимуса, так і лімфовузлів в умовах експериментального імунного гломерулонефриту. Показано, що в експериментальних умовах кількість кумулюсних клітин із пошкодженою ДНК становить 94,5%, а індекс «ДНК – комет» ($I_{дк}$) становив 3,7, що свідчить про зростання пошкодження ДНК. $I_{дк}$ в клітинах тимуса

та в клітинах лімфовузлів, відповідно, 3,3 та 3,7, що свідчить про зростання пошкодження ДНК в цих клітинах. Також відбувається зниження експресії гену *Grem1*, що може бути специфічним маркером порушення оваріальної функції в даних експериментальних умовах.

Висновок. В умовах експериментального імунного гломерулонефриту порушується мейотичне дозрівання ооцитів, зростає загибель кумулюсних клітин та клітин тимуса і лімфатичних вузлів та пошкодження ДНК в ядрах досліджуваних клітин, знижується експресія гену *Grem1*.

Перспективи подальших досліджень повинні бути направлені на дослідження оцінки якості ооцитів за станом геному клітин їх кумулюсного оточення в окремих кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексах. Одержані дані можуть скласти експериментальне обґрунтування для створення нових тест-систем для передбачення якості ембріона і результату вагітності у жінок, зокрема, з імунним гломерулонефритом й запровадження новітніх технік в допоміжних репродуктивних технологіях.

Література

1. Захарова Е. П. Особенности течения и прогноз хронических заболеваний почек при беременности / Е. П. Захарова. – Нефрология и диализ – 2007. – Т.9. – № 3. – С. 240-247.
2. Игнатова М. С. Детская нефрология: Руководство для врачей. 3-е изд., перераб. и доп. / М. С. Игнатова. – МИА – 2011. – 696 с.
3. Коломеец Н. Ю. Разработка модели хронического гломерулонефрита у белых нелинейных крыс / Н. Ю. Коломеец, Н. И. Аверьянова, П. В. Косарева // Современные проблемы науки и образования – 2012. – № 3. – URL: www.science-education.ru/103-6454.
4. Кропачев А. Ю. Разработка модели и морфологическая характеристика почек при неполной (варьирующей) окклюзии мочевыводящих путей / А. Ю. Кропачев, Г. А. Соснин, Д. А. Складенко [и др.] // Бюлл. Волгоградского науч. центра РАМН. – 2008. – № 1. – С. 24-26.
5. Пальцева Е. М. Экспериментальные модели хронических заболеваний почек / Е. М. Пальцева // Клиническая нефрология. – 2009. – № 2. – С. 37-42.
6. Gilbert S. National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases, 6th edition / S. Gilbert, D. Weiner, D. Gipson [et al.] // Elsevier. – 2014. – 592 p.
7. Malik G. Repeated pregnancies in patients with primary membranous glomerulonephritis / G. Malik, A. Al-Harbi, S. Al-Mohaya // Nephron – 2002. – 91 (№ 1). – P. 21-24.

УДК 612.62: 616.155.194: 615.038

МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ І ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ЇХ ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ, ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТУ

Ступчук М. С., Грушка Н. Г., Шепель О. А., Блашків Т. В., Вознесенська Т. Ю.

Резюме. В умовах експериментального імунного гломерулонефриту проводили оцінку параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, загибелі кумулюсних клітин і клітин тимуса й лімфатичних вузлів, а також цілісності ДНК в ядрах досліджуваних клітин, а також експресію специфічних генів у клітинах кумулюсного оточення ооцитів.

Встановлено, що відбувається: 1) зменшення кількості ооцитів в яєчнику до $10,3 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) при $15,2 \pm 0,4$ контролі; зменшення відсотка ооцитів, які поновлюють мейотичне дозрівання до $30,3 \pm 1,1\%$ ($p < 0,01$) при $76,4 \pm 3,2\%$ у контролі, а також зменшення відсотка ооцитів, які формують перше полярне тільце до $25,9 \pm 1,5\%$ ($p < 0,01$) при $53,8 \pm 1,2\%$ у контролі; 2) зменшення кількості живих кумулюсних клітин до $41,9 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$) при $74,2 \pm 1,2\%$ у контролі; збільшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу до $40,3 \pm 0,7\%$ ($p < 0,01$) при $19,0 \pm 0,8\%$ в контролі, а також підвищення рівня некрозу кумулюсних клітин до $17,8 \pm 0,6\%$ при $6,8 \pm 0,4\%$ в контролі; 3) збільшення кількості ядер кумулюсних клітин з одонитковими розривами ДНК: 4 класу до $74,7\%$ при $0,2\%$ у контролі, 3-го класу до $19,8\%$ при $0,6\%$ у контролі, 2-го класу до $4,2\%$ при $2,2\%$ у контролі, тоді як відсоток 1-го класу складає $1,1\%$ при $12,4\%$ у контролі, а 0-го класу (відсутність первинних пошкоджень ДНК) – $0,2\%$ при $84,6\%$ у контролі; 4) зниження експресії гена *Grem1* в 1,47 разів, тоді як експресія *HAS2* і *COX2* вірогідно не змінюється, 1,06 і 1,05 разів відповідно.

Ключові слова: експериментальний імунний гломерулонефрит, ооцити, кумулюсні клітини, пошкодження ДНК, експресія гена *Grem1*.

УДК 612.62: 616.155.194: 615.038

МЕЙОТИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ИХ ФОЛЛИКУЛЯРНОГО ОКРУЖЕНИЯ, ТИМУСА И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИММУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

Ступчук М. С., Грушка Н. Г., Шепель О. А., Блашків Т. В., Вознесенская Т. Ю.

Резюме. В условиях экспериментального иммунного гломерулонефрита проводили оценку параметров мейотического созревания ооцитов, гибели кумулюсных клеток и клеток тимуса и лимфатических узлов, а также целостности ДНК в ядрах изучаемых клеток, а также экспрессию специфических генов в клетках кумулюсного окружения ооцитов.

Показано, что происходит: 1) уменьшение количества ооцитов в яичнике до $10,3 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) при $15,2 \pm 0,4$ контроле; уменьшение процента ооцитов, возобновляющих мейотическое созревание до $30,3 \pm 1,1\%$ ($p < 0,01$) при $76,4 \pm 3,2\%$ в контроле, а также снижение процента ооцитов, формирующих первое полярное тельце до $25,9 \pm 1,5\%$ ($p < 0,01$) при $53,8 \pm 1,2\%$ в контроле; 2) уменьшение количества живых кумулюсных клеток до $41,9 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$) при $74,2 \pm 1,2\%$ в контроле; увеличение количества клеток с морфологическими признаками апоптоза до $40,3 \pm 0,7\%$ ($p < 0,01$) при $19,0 \pm 0,8\%$ контроле, а также повышение уровня некроза кумулюсных клеток до $17,8 \pm 0,6\%$ при $6,8 \pm 0,4\%$ в контроле; 3) увеличение количества ядер кумулюсных клеток с одонитевыми разрывами ДНК: 4 класса до $74,7\%$ при $0,2\%$ в контроле, 3-го класса до $19,8\%$ при $0,6\%$ в контроле, 2-го класса до $4,2\%$ при $2,2\%$ в контроле, тогда как ядра 1-го класса составили $1,1\%$ при $12,4\%$ в контроле, а 0-го класса (отсутствие первичных повреждений ДНК) составил $0,2\%$ при $84,6\%$ в контроле; 4) снижение экспрессии гена Grem1 в 1,47 раз, тогда как экспрессия HAS2 и COX2 достоверно не меняется, 1,06 и 1,05 раз соответственно.

Ключевые слова: экспериментальный иммунный гломерулонефрит, ооциты, кумулюсные клетки, повреждения ДНК, экспрессия гена Grem1.

UDC 612.62: 616.155.194: 615.038

MEIOTIC MATURATION OF OOCYTES AND VIABILITY OF FOLLICULAR, THYMUS AND LYMPH NODES CELLS UNDER EXPERIMENTAL IMMUNE GLOMERULONEPHRITIS

Stupchuk M. S., Hrushka N. H., Shepel O. A., Blashkiv T. V., Voznesenska T. Yu.

Abstract. Glomerulonephritis, including immune etiology presents a problem for the reproductive health of women. Thus, there is evidence of a significant percentage of preterm birth and perinatal fetal loss in patients with membranous glomerulonephritis and IgA-glomerulonephritis. And also the fact that 90% of women with membranous glomerulonephritis observed the birth of healthy children. Reproductive function may be affected both by glomerular disease, and because glucocorticoid and cytostatic therapy. However, at present no data about oocyte meiotic maturation, viability of follicular and immune cells in conditions of experimental glomerulonephritis.

In terms of experimental immune glomerulonephritis it was investigated the oocyte meiotic maturation, the death cumulus and thymus cells and lymph nodes cells and damage DNA in the nuclei of target cells, the expression of the gene Grem1.

Experimental immune glomerulonephritis mice model created by immunizing laboratory mice generation I of antigen suspension kidneys obtained from the parent entity. It was used a technique for *in vitro* culture of oocytes, DNA-comet assay (alkaline) and double fluorescent vital assay. Comets were separated into 5 classes (0; 1; 2; 3; 4) depending on the value of DNA in the «head» and «tail» comet. To quantify the expression of specific genes (HAS2, COX2 and Grem1) in cumulus cells surrounding oocytes used by polymerase chain reaction (PCR).

It was found that experimental immune glomerulonephritis occurs: 1) reducing the amount allocated from one ovary oocytes to $10,3 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) cells vs $15,2 \pm 0,4$; reducing the percentage of oocytes that dissolved germinal vesicle to $30,3 \pm 1,1\%$ ($p < 0,01$) vs $76,4 \pm 3,2\%$ and reduction in the percentage of oocytes capable of forming the first polar body to $25,9 \pm 1,5\%$ ($p < 0,01$) vs $53,8 \pm 1,2\%$ in the control group of animals; 2) reducing the number of live cumulus cells to $41,9 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$) vs $74,2 \pm 1,2\%$; increasing the number of cells with morphological features of apoptosis to $40,3 \pm 0,7\%$ ($p < 0,01$) vs $19,0 \pm 0,8\%$ and improve necrosis cumulus cells to $17,8 \pm 0,6\%$ vs $6,8 \pm 0,4\%$ in the control; 3) increasing the number of cores cumulus cells with DNA single-strand breaks 4 class that describes the maximum DNA damage to $74,7\%$ vs $0,2\%$ of the cells of the same class in the control group; the percentage of cells with ravines 3rd grade increased to $19,8\%$ vs $0,6\%$; the percent of nuclei class 2 to $4,2\%$ vs $2,2\%$, the percentage of cells class 1 was $1,1\%$ vs $12,4\%$, and the percentage of cells grade 0 (no primary DNA damage) was $0,2\%$ vs $84,6\%$ in the control cells; 4) downregulation of gene Grem1 expression in 1.47 times, while the expression of COX2 and HAS2 not changed significantly, 1.06 and 1.05 times, respectively.

Thus, under the condition of experimental immune glomerulonephritis it was observed oocytes damage, namely the suppression of meiotic maturation, reduction of the number of living cells of lymph nodes, thymus and cumulus cells surrounding oocytes, nuclear DNA damage of the cumulus, thymus and lymph nodes cells, reduced expression of the gene Grem1.

Further research should be directed to research assessing the quality of oocytes as genome cumulus cells surrounding them in some cumulus-oocyte-cell-complexes (COCC). The data can make a pilot study to create new test systems to predict embryo quality and pregnancy outcome in women, particularly in immune glomerulonephritis and introduction of new techniques in assisted reproductive technologies.

Keywords: experimental immune glomerulonephritis, oocytes, cumulus cells, DNA damage, gene expression Grem1.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 31.10.2015 року